



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

HERCYLIANNA PAMPLONNA HELYSAROMMA ROSSA MONTURIL

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERMELHA
Digenea simplex DIMINUI OS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E O ESTRESSE
OXIDATIVO DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS EM RATOS.**

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016

HERCYLIANNA PAMPLONNA HELYSAROMMA ROSSA MONTURIL

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERMELHA
Digenea simplex DIMINUI OS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E O ESTRESSE
OXIDATIVO DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS EM RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016

HERCYLIANNA PAMPLONNA HELYSAROMMA ROSSA MONTURIL

**POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERMELHA
Digenea simplex DIMINUI OS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E O ESTRESSE
OXIDATIVO DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS EM RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Orientador)

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Membro)

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Membro)

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016

Dedico esta dissertação:
A Deus e ao Meu Esposo Fabrício.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade que me foi dada para realização de um sonho, pela força e coragem de enfrentar os momentos difíceis e por me guiar e proteger sempre.

Ao meu esposo, Fabrício, pela cumplicidade e apoio incondicional. Pela dedicação, paciência, companheirismo, amizade, compreensão, alegria e amor que me foram dados durante todo esse tempo. Maior incentivador na superação dos meus limites. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

A minha mãe Fátima pelas diversas vezes em que me ajudou e me apoiou nesta caminhada.

Aos meus irmãos Palomma, Ozamir, Jean, Lucas, Hercílio Neto e Thiago, meus agradecimentos pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu avô Hercílio José da Rosa (in memorian), que sempre me incentivou a crescer pessoal e profissionalmente.

Agradeço também a minhas cunhadas Fabiana, Carolina, Nayara, Andréia e ao cunhado Júnior pelo carinho.

Aos meus sogros pelo incentivo durante esse período de caminhada.

Ao meu chefe Antônio Lobão, pela compreensão durante esses dois anos. A Francisca Maria, carinhosamente chamada Chiquinha, pela disponibilidade e parceria oferecidas. E a todos os funcionários do Laboratório Lobão que me ajudaram durante minhas ausências necessárias para concretização deste sonho.

As minhas amigas Silvana Lopes, Geisyane, Taís Ibiapina e Tarcília Dalles. Obrigada pelo apoio.

Aos amigos Ernani Torres e Kristian Pessoa pela disponibilidade dispensada.

Agradeço ao meu orientador, André Luiz dos Reis Barbosa, pelos seus ensinamentos e orientações.

Aos amigos do mestrado, especialmente Moara Silva e Tarcísio Brito por suas valiosas contribuições.

Aos colaboradores do Laphis, especialmente Professor Daniel Vasconcelos e ao Felipe Rodolfo. Aos professores e alunos do Laphex (UFPI) e Lafica (UFC) pela contribuição a este trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Biomédicas pelo convívio e aprendizado.

A todos aqueles que torceram por mim e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	v
LISTA DE TABELAS	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Doença de Crohn	3
2.2 Fisiopatologia da Doença de Crohn.....	5
2.3 Modelo experimental da Doença de Crohn	6
2.4 Tratamento Farmacológico da Doença de Crohn	7
2.5 Algas Marinhas	9
2.5.1 <i>Digenea simplex</i>	10
2.5.2 Polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas como bioprodutos com atividade farmacológica.....	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Animais.....	14
4.2 Grupos experimentais	14
4.3 Padronização do modelo de Doença de Crohn experimental	15
4.3.1 Modelo de doença de Crohn experimental induzido por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).	15
4.3.2 Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos da lesão.	16
4.3.3 Avaliação do peso úmido dos cólons de animais com ou sem colite.	17
4.4 Ensaio Bioquímicos	17
4.4.1 Avaliação da Atividade da MPO	17
4.4.2 Dosagem de TNF- α e IL-1 β no tecido intestinal.	18
4.4.3 Ensaio para dosagem de MDA	18
4.4.4 Ensaio para dosagem de GSH.....	19
4.4.5 Determinação de nitrato e nitrito na mucosa intestinal	19
4.4.6 Análise Estatística.....	20

5 RESULTADOS	21
5.1 Escores macroscópicos	21
5.2 Peso úmido.....	22
5.3 Escores histopatológicos.....	23
5.4 Infiltração neutrofílica no cólon – Atividade da MPO	24
5.5 Concentração de MDA no intestino	25
5.6 Concentração de GSH no intestino.....	26
5.7 Dosagem de Nitrato e Nitrito.....	27
5.8 Dosagem da citocina IL-1 β	28
5.9 Dosagem da citocina TNF – α	29
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÊNDICE	46
ANEXO	48

RESUMO

A doença inflamatória intestinal é caracterizada como uma inflamação crônica da mucosa intestinal, como exemplo, pode-se incluir a Doença de Crohn, a qual possui etiologia idiopática e mecanismos ainda incertos. Há relatos do uso de polissacarídeos de algas marinhas como anti-inflamatórios e gastroprotetores. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diminuição da resposta inflamatória no curso do desenvolvimento da colite experimental induzida por TNBS em ratos. Para tanto, avaliou-se como parâmetros inflamatórios os escores macroscópicos e microscópicos, o peso úmido, atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA), glutationa (GSH), nitrato e nitrito e as citocinas TNF- α e IL-1 β . Utilizaram-se fêmeas de ratos wistar, distribuídas em quatro grupos (SAL, TNBS, PLS e DEXA) com seis animais em cada, submetidos a indução de colite por TNBS diluído em etanol a 50%. O controle do modelo foi o grupo Salina (SAL). Os animais com colite foram tratados com o polissacarídeo da alga *Digenea simplex* (PLS) e Dexametasona (DEXA) 1mg/Kg. Após três dias, foi coletado segmento de cólon para análises macroscópicas e microscópicas, peso úmido, dosagem da atividade de mieloperoxidase, malondialdeído, glutationa, nitrato e nitrito e das citocinas TNF- α e IL-1 β . Os dados paramétricos foram analisados por do teste de Newman-Keuls e para a análise dos escores microscópicos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Verificou-se que houve aumento do escore macroscópico e peso úmido no grupo TNBS e redução desse evento no grupo PLS. O grupo TNBS apresentou aumento na atividade de MPO no cólon em relação aos demais grupos. O grupo TNBS apresentou aumento na pontuação dos escores microscópicos em relação aos grupos tratados. O grupo PLS apresentou diminuição na concentração de malondialdeído no cólon em relação ao grupo TNBS. Em se tratando da glutationa, percebeu-se que ocorreu um aumento significativo no grupo PLS quando comparado com o grupo TNBS. O grupo TNBS apresentou aumento na concentração das citocinas (TNF- α , IL-1 β) quando comparado aos grupos tratados. O grupo PLS apresentou redução na concentração de nitrato e nitrito em relação ao grupo TNBS. Concluiu-se que o polissacarídeo da alga marinha *Digenea simplex* apresentou ação antiinflamatória e reduziu o estresse oxidativo durante a colite induzida por TNBS em ratos.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal, Doença de Crohn, Alga Marinha

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease is characterized as a chronic inflammation of the intestinal mucosa, for example, may include Crohn's disease, which has idiopathic and mechanisms still uncertain. There are reports of the use of polysaccharides from seaweed as anti-inflammatory and gastroprotectors. This study aimed to evaluate the reduction of the inflammatory response during the development of experimental colitis induced by TNBS in rats. Therefore, it was evaluated as inflammatory parameters macroscopic and microscopic scores, the wet weight, activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), nitrate and nitrite and TNF- α and IL-1 β . They used female Wistar rats, divided in four groups (SAL TNBS PLS and DEXA) with six animals in each subjected to induction of colitis by TNBS diluted in 50% ethanol. The model was the control group saline (SAL). The animals with colitis were treated with the polysaccharide from seaweed *Digenea simplex* (PLS) and dexamethasone (DEXA) 1mg/kg. After three days, it was collected colon segment for macroscopic and microscopic analyzes, wet weight, determination of myeloperoxidase activity, malondialdehyde, glutathione, nitrate and nitrite and TNF- α and IL-1 β cytokine. Parametric data were analyzed by the Newman-Keuls test for analysis and microscopic scores was used Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. It was found that there was an increase of the macroscopic score and wet weight in the TNBS group and reduction of this event in the PLS group. The TNBS group showed an increase in MPO activity in the colon compared to other groups. The TNBS group showed an increase in scores microscopic scores in relation to the treated groups. The PLS group showed decrease in the concentration of malondialdehyde in the colon compared to the TNBS group. In the case of glutathione, it was noticed that there was a significant increase in the PLS group compared to the TNBS group. The TNBS group had increased concentrations of cytokines (TNF- α , IL-1 β) when compared to the treated groups. The PLS group showed a reduction in the concentration of nitrate and nitrite in relation to the TNBS group. It was concluded that the polysaccharide from kelp *Digenea simplex* showed anti-inflammatory action and reduced oxidative stress during TNBS-induced colitis in rats.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, Crohn's Disease, Seaweed

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Anti-inflamatórios não esterodais
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DC – Doença de Crohn
DEXA – Dexametasona
DIIs – Doenças inflamatórias intestinais
DTNB – Reagente de Ellman
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
GSH – Glutationa
HE – hematoxilina e eosina
IL – Interleucina
MDA –Malondialdeído
MPO – Mieloperoxidase
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NO – Óxido nítrico
NO₂ – Nitrito
NO₃ – Nitrato
PLS – Polissacarídeo sulfatado
RCU – Retocolite Ulcerativa
TCA – Ácido tricloroacético
TNBS – Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF – Fator de necrose tumoral
VHS - Velocidade de Hemossedimentação

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 – Principais citocinas envolvidas na Doença de Crohn e suas funções.	5
Figura 2 – Alga marinha vermelha <i>Digenea simplex</i>	10
Figura 3 – Indução da colite.	15
Figura 4 – A fração de polissacarídeo extraído da alga <i>Digenea simplex</i> melhora as alterações histopatológicas em colite induzida por TNBS.	23

LISTA DE GRÁFICOS

	Páginas
Gráfico 1 - Escores macroscópicos dos cólons intestinais no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.....	21
Gráfico 2 – Avaliação do peso intestinal úmido no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.....	22
Gráfico 3 – Atividade da MPO no intestino no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.....	24
Gráfico 4 – Concentração de MDA no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.....	25
Gráfico 5 – Concentração de GSH no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.....	26
Gráfico 6 - Avaliação da concentração de Nitrato e Nitrito no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	27
Gráfico 7 – Avaliação da concentração de IL-1 β no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS..	28
Gráfico 8 – Avaliação da concentração de TNF - α no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	29

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 – Escores macroscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal. .	16
Tabela 2 - Escores microscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal. ..	16
Tabela 3 – Escores microscópicos no intestino, no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.....	23

1 INTRODUÇÃO

O conjunto de seres vivos classificados como alga apresenta-se com características bastante diferenciadas (ASSREUY et al., 2008; ANANTHI et al., 2010). A sua grande diversidade biológica e sua ocorrência em praticamente todos os ambientes do planeta demonstram a importância desses seres vivos para os ecossistemas, compondo a base das cadeias alimentares dos mares e oceanos (RAVEN et al., 2001).

Algas como as macroalgas marinhas podem ser consideradas como uma fonte potencial de nutrientes devido possuírem grandes quantidades de carboidratos e proteínas (LAURENZIO, 2010). Dentro desse contexto, podemos citar as algas vermelhas, as quais formam um grupo extremamente diversificado. As rodófitas ou algas vermelhas são diferenciadas dos outros grupos de algas pela combinação de algumas características como clorofilas A e D além de ficobilinas, armazenam o amido das florídeas e são ricas em polissacarídeos (RAVEN et al., 2001). Como exemplo dessa classe de algas podemos citar a *Digenea simplex*. Os polissacarídeos sulfatados (carboidratos) de algas vermelhas têm sido extensivamente estudados, principalmente devido ao seu potencial anticoagulante, antitrombótico e anti-inflamatório (FELDMAN, GARDNER, DENISON, 1979; SILVESTRE et al., 2008).

Como exemplo de doenças de caráter inflamatório, pode-se citar as Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) que se caracterizam por inflamações intestinais crônicas as quais se manifestam clinicamente principalmente por sintomas como, diarreia e dores abdominais. Como exemplo de doença inflamatória intestinal tem-se a Doença de Crohn (DC) (SANTOS, 2013). Essa doença é de origem idiopática podendo atingir diversos segmentos do tubo digestivo afetando desde segmentos proximais, como a boca, a segmentos mais distais, como o ânus. Atualmente, estima-se que o mundo possui aproximadamente 4 milhões de pessoas com DC, sendo que as maiores taxas registradas são na Europa, com 2,2 milhões de pessoas afetadas, seguida de 1,4 milhões de pessoas afetadas nos Estados Unidos. (HANAUER, SANDBORN, 2001).

As manifestações clínicas da DC geralmente iniciam na idade adulta jovem, entre a segunda e terceira décadas de vida, ou tardiamente, em um segundo pico entre a quinta e sexta décadas de vida, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária (POLI, 2007; BELASCO, SOUZA, NASCIMENTO, 2008). Estudos recentes evidenciam que a incidência da DC vem aumentando de forma lenta e progressiva, principalmente quando a avaliação é realizada sobre a população infantil. Estes demonstram que a doença, que raramente inicia antes dos

10 anos, em geral começa entre os 12 e 18 anos de idade, o que faz com que seu maior pico de incidência fique ao redor dos 20 anos (POLI, 2007; MARCELINO, 2012).

As principais características clínicas da Doença de Crohn incluem: febre, dor abdominal difusa, diarreia e fadiga generalizada. Pode ocorrer também perda de peso. A diarreia e a dor abdominal são mais frequentes quando há envolvimento colônico. Na maioria dos pacientes, o curso é crônico e intermitente, independente do segmento acometido (FARIA, FERRARI, CUNHA, 2004). Além das manifestações no trato intestinal, a Doença de Crohn pode acometer outros órgãos com manifestações fora do sítio do intestino, sendo as mais comuns às oftalmológicas, as de cunho dermatológico e as reumatológicas (HANAUER, SANDBORN, 2001; GABURRI et al., 1998).

Atualmente sabe-se que a DC possui etiologia e fisiopatologia mal definidas, sendo um problema de saúde pública, por não possuir protocolo de tratamento definido, acometer muitos jovens e o tratamento farmacológico oferecer diversos efeitos colaterais. Neste trabalho sugere-se um tratamento natural baseado no polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Digenea simplex* pois foi comprovado no trabalho de Pereira et al (2014) que o polissacarídeo isolado da *Digenea simplex* inibiu respostas nociceptivas e inflamatórias na peritonite, funcionando como agente terapêutico e por conta disso resolveu-se testar a atividade antiinflamatória em um modelo experimental de doença, no caso a Doença de Crohn.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença de Crohn

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são caracterizadas por uma inflamação crônica da mucosa intestinal e podem ser limitadas a zona intestinal ou abranger outros órgãos subjacentes (SANTOS, 2013). As DIIs, termo que compreende doenças de caráter crônico e recidivante, sendo elas a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), são um problema de saúde pública em muitos países. E a sua incidência varia dentro de regiões diferentes. Suas etiologias permanecem mal definidas (Marcelino, 2012).

Sugere-se que as DIIs decorram de anormalidades imunológicas celulares, ou seja, da reatividade anormal dos linfócitos T da mucosa gastrointestinal a uma microflora normal não patogênica, porém a patogênese permanece desconhecida. As DIIs caracterizam-se por inflamação intestinal crônica não infecciosa e manifestam-se clinicamente por diarreia, dor abdominal e náuseas. A mortalidade é baixa e geralmente acontece nos primeiros anos da doença e isso ocorre quando há alterações nutricionais, podendo causar desidratação e anemia, que aumentam a morbidade gerada pelas crises de diarreia. Nas doenças de longa duração a mortalidade está associada ao risco de câncer de cólon (BIONDO-SIMÕES et al., 2003).

A Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por um processo inflamatório crônico transmural, persistente ou recidivante, de intensidade variável, não curável por tratamento clínico ou cirúrgico e que acomete o trato gastrointestinal de forma uni ou multifocal, que compromete não só a mucosa como também a parede intestinal, o mesentério e os gânglios linfáticos, podendo ocorrer de forma descontínua, em qualquer região do trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus (SANTOS, MARTINS, 2013).

As maiores taxas de incidência da DC são observadas em indivíduos com idade entre 15 e 30 anos, tem predileção por mulheres, atinge pessoas que pertencem a um nível socioeconômico mais elevado, sendo as maiores taxas encontradas nos países industrializados, e, além disso, esta doença é mais frequente em indivíduos brancos (MARCELINO, 2012). As manifestações clínicas da doença geralmente iniciam na idade adulta jovem, entre a segunda e a terceira décadas de vida, podendo ocorrer em qualquer faixa etária e em ambos sexos. (SANTOS, 2011).

No Brasil, uma pesquisa recente em relação à raça e grupo étnico na DC, demonstrou que pessoas de raça branca e parda têm maior incidência do que na raça negra, amarela e indígena (POLI, 2007). Devido essa doença não ser de notificação compulsória no Brasil, a prevalência real estaria sendo subestimada (BELASCO, SOUZA, NASCIMENTO, 2008). Houve um aumento considerável nos casos de DC no sudeste do Brasil, conforme levantamento realizado junto ao Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SP - Brasil) (OLIVEIRA, EMERICK, SOARES, 2010).

Como citado anteriormente, a DC possui etiologia desconhecida, porém sabe-se que possui causa multifatorial, envolvendo fatores genéticos, imunológicos, e ambientais que desencadeiam situações inflamatórias. A DC é diferenciada de qualquer outra doença inflamatória intestinal pela sua natureza inflamatória, pela localização da lesão no aparelho gastrointestinal e pela sua distribuição e penetração na mucosa. As manifestações mais características, ocorridas inicialmente, são a formação de úlceras, provenientes do processo inflamatório, estreitamento do lúmen, espessamento da parede intestinal e granulomas na mucosa (SANTOS, 2013). Na evolução, podem surgir complicações locais nutricionais e sistêmicas (BIONDO-SIMÕES et al., 2003).

Atualmente o fator genético tem sido um dos mais discutidos dentre os fatores causadores da DC. Foi descoberta a associação de variações do gene nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), com a ocorrência de DC. Portadores dessas variações são mais propensos a ter envolvimento ileal e complicações relacionadas com fibroestenose. Esses portadores da DC com polimorfismos no gene NOD2 têm dificuldades no reconhecimento e eliminação de produtos bacterianos, levando a uma resposta inflamatória longa ou ineficaz. Porém, somente variações em NOD2, não são suficientes para causar a DC, o que indica a complexidade de um distúrbio multifatorial (ESBERARD, 2012; ABRAHAM, CHO, 2007).

Os sintomas clínicos mais relatados na DC incluem diarreia crônica com presença de muco ou sangue, dor abdominal, perda de peso, náusea e vômito, anemia, febre, má absorção, disfunção da barreira mucosa e fatores que causam deficiências nutricionais e funcionais (SANTOS, MARTINS, 2013). Para a realização do diagnóstico da DC pode-se citar exames tais como: hemograma, VHS (Velocidade de Hemossedimentação), análises bioquímicas, pesquisa de sangue oculto e cultura das amostras de fezes, Raio X abdominal, endoscopia, colonoscopia e exame

anatomopatológico – biópsia (BERNSTEIN et al., 2010; MOWAT et al, 2011; ORTIGOSA, 2005; SOLBERG et al., 2009; STANGE et al., 2008).

2.2 Fisiopatologia da Doença de Crohn

Indivíduos com DC possuem um desequilíbrio entre a resposta imune e tolerância a antígenos normalmente inócuos e isso origina um processo inflamatório crônico com consequente lesão tecidual (SANTOS, 2013). Em pacientes com DC, a resposta inflamatória a qualquer estímulo antigênico, é exacerbada, contrariamente ao que se verifica em indivíduos saudáveis, resultando daí um sistema imunitário cronicamente ativado e uma mucosa intestinal inflamada (HEAD, JURENKA, 2004).

De acordo com Bilate (2007), as citocinas são estruturas proteicas, produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune. Entre as atividades fisiológicas que as citocinas possuem, destacam-se as atividades ao nível da resposta imunológica inata e adaptativa, conforme a tabela da Figura 1.

Figura 1 – Principais citocinas envolvidas na Doença de Crohn e suas funções.

1. Citocinas relacionadas à resposta imune inata		
TNF- α	Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); caquexia; morte celular; ativação de neutrófilos
IL-1	Monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Vasculatura (inflamação); hipotálamo (febre); fígado (indução de proteínas de fase aguda)
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativa células NK, promove a diferenciação de células Th1
IL-6*	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Fígado (induz proteínas de fase aguda), promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe diferenciação de células Treg
IFN- α	Macrófagos	Induz resposta antiviral, aumenta a expressão de MHC classe I e ativa células NK
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th17
2. Citocinas relacionadas à resposta imune adaptativa		
IL-2	Células T	Induz proliferação de células T e B, ativação de células NK e pode promover morte induzida por ativação
IFN- γ	Células Th1, células T CD8+, células NK	Ativa macrófagos, induz a expressão de MHC classe I e classe II, aumenta apresentação de antígenos
IL-5*	Células Th2	Promove diferenciação e ativação de eosinófilos
IL-4	Células Th2, mastócitos	Promove a diferenciação de células Th2 e mudança de classe de anticorpos para IgE
IL-17	Células Th17, neutrófilos	Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais
IL-10	Macrófagos, células dendríticas, linfócitos Treg	Inibe proliferação de células Th1
TGF- β	Células T, macrófagos, fibroblastos	Inibe proliferação de células T e B, inibe ativação de macrófagos, promove mudança de classe de anticorpos para IgE e diferenciação de células Treg

Fonte: Bilate, 2007

Estudos realizados em pacientes com a DC demonstraram níveis aumentados de células Th1, da citocina IL-12, TNF- α e IFN- γ . Estas citocinas estão envolvidas no recrutamento de mais células inflamatórias da corrente sanguínea sendo que o processo de produção e liberação de citocinas pode causar o aparecimento de determinadas complicações, como, ulcerações e o aumento da permeabilidade intestinal (AROSA, CARDOSO, 2007). Segundo Peluso, Palone, Monteleone (2006) pacientes com DC apresentam também níveis elevados de IL-23, produzida essencialmente por células mononucleares é considerada a principal reguladora dos níveis de TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-17, no intestino (PELUSO, PALONE, MONTELEONE, 2006).

A hipótese de a Doença de Crohn ser causada por uma deficiência imunitária do intestino é sugerida pela natureza crônica e recorrente da inflamação. Atualmente, reconhece-se que a susceptibilidade genética para a DC é bastante diversa, com inúmeras mutações gênicas identificadas que contribuem para o aumento do risco e que modulam as características da doença. (RUBIN, PALAZZA, 2006).

Na literatura, o gene NOD2/CARD15 é um dos mais discutidos quando se trata de DC. O produto do gene NOD2/CARD15 é classificado como sendo um receptor de reconhecimento padrão envolvido na imunidade inata. O sistema imunológico inato é capaz de detectar padrões moleculares associados a patógenos, tais como lipopolissacarídeos (LPS), flagelinas e lipoproteínas, como, por exemplo, os recetores Toll-Like (TLR) e NOD. Entre a família NOD, o NOD2 também designado por CARD15 é uma proteína citoplasmática que está presente, principalmente, nos monócitos e macrófagos (CHAMBERLIN, NASER, 2006). A sua função é regular a inflamação e a apoptose através da ativação de vias pró-inflamatórias, como é o caso da via do fator nuclear-kB (NF-kB) levando a um aumento da produção de citocinas inflamatórias, como, IL-1 β , TNF- α . Devido as alterações no gene que produz esse componente protéico, o combate a injúria tecidual gerada pelo componente bacteriano fica deficiente (ABRAHAM, CHO, 2007). A proteína NOD2/CARD15 também pode expressar-se nas células intestinais epiteliais, onde desempenham um papel antibacteriano, funcionando como um sensor na detecção de bactérias (GIRARDIN et al., 2003).

2.3 Modelo experimental da Doença de Crohn

Diversos mecanismos têm sido descritos como causadores das Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs), indo desde fatores gênicos até os imunológicos, sem

ainda haver consenso entre os autores. Além disso, o tratamento e o controle da doença ainda constituem um desafio para os pesquisadores. Consequentemente, a necessidade de esclarecer os mecanismos fisiopatogênicos e as formas de tratamento eficazes contra as DIIs fez surgir modelos experimentais de Doença de Crohn em animais (ELSON et al., 2005). Estes modelos experimentais contribuem para a avaliação dos fatores imunológicos envolvidos e tentativas na elucidação dos possíveis mecanismos de instalação da doença, pois os modelos animais freqüentemente utilizados são induzidos por enemas de ácidos ou substâncias corrosivas diluídas e durante a sua evolução, por um período de tempo determinado, apresentam-se histologicamente similares às DIIs humanas (ELSON et al., 2005).

Trabalhos publicados que utilizaram modelos experimentais de colite em ratos mostraram que a administração retal de vários compostos químicos foi eficiente na indução de modelos de colites. Dentre esses trabalhos pode-se citar MORRIS et al, (1989) que propuseram um modelo de colite difusa por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), diluído em etanol a 50%, administrado por via retal e que poderia ser reproduzido em 100% dos casos.

A lesão é inicialmente produzida pela ação do álcool, um potente pró-inflamatório, que quebra a barreira do cólon e altera a permeabilidade. O TNBS é metabolizado pelas enzimas do cólon produzindo uma reação imunomediada por citocinas pró-inflamatórias e substâncias citotóxicas. Nesse modelo a lesão pode ser aguda ou crônica dependendo da dose de TNBS a ser administrada (YAMADA et al., 1993). Esse modelo de DII vem sendo usado como padrão na indução experimental da Doença de Crohn em animais (NEURATH et al., 2002; STROBER, FUSS, BLUMBERG, 2002). Essa substância quando administrada via retal em ratos promove uma inflamação crônica mediada por células Th1, um aumento da produção de IL-12 por macrófagos que compõem a mucosa intestinal além de uma alteração genética do NOD2 que leva a uma falha no combate a injúria tecidual gerada pelo componente bacteriano (BOUMA, STROBER, 2003).

2.4 Tratamento Farmacológico da Doença de Crohn

O tratamento dos pacientes com DC depende da localização anatômica e da severidade da doença (ENGEL, NEURATH, 2010; MOWAT et al., 2011) sendo basicamente o tratamento clínico-farmacológico e cirúrgico (MARCELINO, 2012). Os

principais grupos de fármacos que são usados nas doenças inflamatórias intestinais são os corticóides, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), antibióticos, aminossalicilatos, imunossupressores e o Infliximab.

Os corticóides são muito utilizados na terapia das doenças autoimunes sendo também utilizados no tratamento das agudizações manifestadas em qualquer segmento do trato gastrointestinal (HANAUER et al., 2001). Seu uso reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , porém o uso crônico desses medicamentos tem elevada toxicidade e, por este motivo, seu uso fica limitado (COURA, 2011). A eficácia dos corticóides ficou estabelecida através de dois ensaios clínicos randomizados, em que prednisona e metilprednisolona foram utilizadas em pacientes com doença ativa. Nesse estudo foi mostrado que o uso de ambos os medicamentos resultou na melhoria do quadro inflamatório da DC (SUMMERS et al., 1979). Porém a corticoterapia empregada no tratamento dessa doença leva a quadros de dependência do indivíduo (BALDASSANO, PICCOLI, 1999).

Os AINES são fármacos que possuem um amplo espectro de indicações terapêuticas, tendo como principais efeitos: anti-inflamatório, analgésico e antipirético (JÚNIOR, 2006). Paralelo aos efeitos benéficos, os AINES causam diversos efeitos colaterais tais como lesões agudas da mucosa gastroduodenal, úlcera gastroduodenal, esofagite, enterite, reativação de doenças inflamatórias intestinais (Crohn e RCU), diverticulite, úlcera de cólon, lesões renais (dose-dependente) e hepáticas (ZATERKA, 2000).

Os Aminossalicilatos utilizados no tratamento da DC são a sulfassalazina e a mesalazina porém, de acordo com Stein, Lichtenstein, (2001), o mecanismo de ação desses fármacos *in vivo* ainda não está completamente elucidado. EWE et al (1989) afirmam que durante o uso constante de mesalazina, os pacientes com insuficiência renal têm maiores chances de desenvolver nefrite intersticial e síndrome nefrótica, e que a sulfassalazina pode ser prescrita para o tratamento agudo da DC, porém seu uso prolongado leva ao aparecimento de inúmeras reações adversas, como, cefaléia, vômitos, dores abdominais e hemólise.

Os antibióticos alteram a flora intestinal e diminuem a estimulação antigênica do sistema imune da mucosa intestinal, sendo usados no tratamento primário ou nos casos das infecções intercorrentes. Os tipos mais utilizados nesse caso são: Metronidazol e Ciprofloxacina (SANTOS, 2011). Um estudo demonstrou a eficácia do uso da ciprofloxacina quando comparou a ação dessa droga com a ação da mesalazina. Esse

estudo mostrou que o uso comparativo de ciprofloxacina (1 g/dia) e mesalazina (4 g/dia) em 40 pacientes com DC leve a moderada resultou em efeito terapêutico similar (56% para mesalazina versus 55% para ciprofloxacina) sugerindo assim que a ciprofloxacina seja tão eficaz quanto a mesalazina nessa situação clínica. (COLOMBEL et al., 1999; WOOD, 1996).

Dentre os imunossuppressores utilizados no tratamento da DC podemos citar a azatioprina e seu metabólito, a 6-mercaptopurina. Os dados terapêuticos dessas duas medicações são analisados em conjunto, pois a azatioprina é convertida de maneira não enzimática a 6-mercaptopurina, e não há estudo mostrando superioridade entre elas (LICHTENSTEIN, 2000). A azatioprina/6-mercaptopurina pode levar a quadros de leucopenia e/ou trombocitopenia grave, e o teste do hemograma completo deve ser realizado semanalmente no primeiro mês, quinzenalmente no segundo e terceiro meses. Também deve ser realizado testes das funções hepáticas, na mesma periodicidade do hemograma nos primeiros seis meses e depois trimestralmente. (CAMPBELL, GHOSH, 2001)

Outra alternativa terapêutica utilizada para o tratamento da DC é o Infliximab. Infliximab é um anticorpo monoclonal com atividade antifator de necrose tumoral. A utilidade deste novo fármaco na DC foi estudada em pacientes com agudizações moderadas a graves, fístulas e como terapia de manutenção (PRESENT et al., 1999). Embora esse anticorpo seja potente no combate do desenvolvimento da DC, ele pode levar a reativação de quadros de tuberculose em pacientes portadores dessa patologia intestinal (LIM et al., 2002).

Diante de tantos efeitos colaterais proporcionados pelas medicações atualmente utilizadas para o tratamento da DC, convém a implementação de novas ferramentas terapêuticas no tratamento desta doença. Como será visto adiante, o presente estudo sugere como tratamento a utilização do polissacarídeo sulfatado da alga *Digenea simplex*.

2.5 Algas Marinhas

Algae é o plural latino de alga, nome usado entre os romanos para designar certas plantas destituídas de raiz, caule e folhas, de coloração parda, vulgarmente chamadas sargaços, que eram lançadas na praia durante as ressacas. As algas são ubíquas e ocorrem em ampla variedade de habitats, possuindo diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência (BICUDO, MENEZES, 2010).

Nos últimos anos, os recursos marinhos têm atraído a atenção como fonte de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos medicamentos e alimentos saudáveis. Em particular, as algas, pois são uma fonte muito importante e com valor comercial para a indústria de gêneros alimentícios, servindo também como condicionadores de solo. Além disso são utilizadas na medicina tradicional por causa de seus benefícios à saúde (MEDEIROS et al., 2012).

Um estudo feito por Brito et al (2013) com a alga *Hypnea musciformis* comprovou um efeito anti-inflamatório na peritonite devido ter reduzido a migração neutrofílica para a cavidade peritoneal. Outra pesquisa do mesmo autor realizada agora com a alga *Gracilaria birdiae* mostrou diminuição dos parâmetros inflamatórios decorrentes da colite induzida por TNBS, por reduzir mieloperoxidase (MPO) e malondialdeído (MDA) e aumentar glutathione (GSH) (BRITO et al, 2014). Tais estudos comprovaram, portanto, os efeitos anti-inflamatórios presentes em algumas das várias algas marinhas existentes na natureza, dando margem a outros estudos para a verificação das potencialidades medicinais de outras algas.

2.5.1 *Digenea simplex*

A alga marinha aqui estudada, pertence ao reino *Plantae*, filo *Rhodophyta*, classe *Florideophyceae*, ordem *Ceramiales*, família *Rhodomelaceae*, gênero *Digenea*, e espécie *Digenea simplex*. Possui talos eretos vermelho acastanhados como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Alga marinha vermelha *Digenea simplex*.



Disponível em: http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=266054

A ramificação do eixo principal é basicamente dicotômica mas pode tornar-se irregular devido a produção de ramificações laterais. Seus talos podem chegar até 9 cm de altura. Possui distribuição nos oceanos pacífico e atlântico e tem preferência por clima tropical. Cresce geralmente na faixa entre marés, até profundidades de 20 m, em fragmentos de corais, rochas ou outros substratos rígidos. Tem como aplicações medicinais: anti-helmíntico, vermífugo e laxante nos casos de infestação parasitária por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, e Tênia (*Taenia sp*) (GUIRY, 2001).

Dessa forma, derivados de produtos naturais apresentam-se como uma fonte atraente de novas drogas e muitos têm mostrado resultados promissores para a clínica, seja como fonte no desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas ou como um produto adjuvante no tratamento de patologias que envolvem o processo inflamatório (ROZAS, FREITAS, 2007).

A matriz mucilagínosa que envolve a parede celular das algas marinhas vermelhas é composta por galactanas sulfatadas e são conhecidas também como carragenanas ou agaranas. Muitas pesquisas demonstram que as atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados dependem da densidade de cargas, teor de sulfato, estrutura química, peso molecular e conformação de cadeia (COURA, 2011).

2.5.2 Polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas como bioprodutos com atividade farmacológica

Segundo BLUNT et al (2006), a intensa investigação de diversas espécies do hábitat marinho sugere que este hábitat é uma fonte rica em compostos bioativos, podendo-se citar os polissacarídeos. Diversas ações biológicas desses polissacarídeos tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, anticoagulante, já foram relatadas.

Os polissacarídeos sulfatados representam uma classe de macromoléculas polianiónicas complexas e heterogêneas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregadas negativamente devido a presença de grupos sulfatados. Embora também encontrados em gramíneas marinhas, um grupo de plantas vasculares presentes em ambientes marinhos (AQUINO et al., 2005), esses polímeros ocorrem principalmente nos reinos animal (vertebrados e invertebrados) (CÁSSARO, DIETRICH, 1977; MATHEWS, 1975) e protista, onde são encontrados em grandes quantidades nas algas marinhas (PEREIRA et al., 2005).

As algas marinhas são as fontes mais importantes de polissacarídeos sulfatados que não são de origem animal (COSTA et al., 2010). Estudos recentes mostraram o efeito protetor da fração de um polissacarídeo sulfatado da alga *Hypnea musciformis* através da reversão de danos gástricos induzidos por etanol por meio da via de ativação NO/KATP (DAMASCENO, et al., 2013). Outro trabalho relata que ratos com colite foram induzidos com TNBS tiveram melhora quando tratados com uma fração de polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Gracilaria birdiae* (BRITO, et al. 2014). Segundo BATISTA et al (2014), um polissacarídeo isolado da alga *Agardhiella ramosissima* demonstrou atividade anti-inflamatória em ensaio de edema de pata.

Como citado anteriormente, o tratamento atual da DC inclui o uso de corticóides, antibióticos, aminossalicilatos e os antiinflamatórios não-esterodais que juntos promovem a diminuição de parâmetros inflamatórios dessa classe de doenças por inibir a exacerbação do componente imune responsável pela instalação e cronificação do processo inflamatório. Entretanto, o uso dessas drogas por períodos prolongados pode levar ao aparecimento de sérios efeitos colaterais e assim limitar seu próprio uso. Devido os diversos efeitos colaterais que o tratamento farmacológico pode ocasionar nos pacientes portadores da Doença de Crohn, se faz necessária a busca por alternativas no tratamento desta doença.

Com isso este trabalho se faz importante pois o polissacarídeo sulfatado presente na alga *Digenea simplex*, pode ser considerado uma nova opção no tratamento em modelos experimentais da DC, visto que sua atividade anti-inflamatória já foi comprovada em experimentos iniciais. Este estudo pode então favorecer a descoberta de novos agentes terapêuticos com ação no controle da inflamação, constituindo-se como ferramenta importante, em se tratando de doenças inflamatórias, como a Doença de Crohn.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

✓ Descrever os efeitos do polissacarídeo sulfatado da *Digenea simplex* (PLS) sobre os parâmetros inflamatórios e deletérios da mucosa colônica durante a colite induzida por TNBS em ratos.

3.2 Objetivos específicos

✓ Analisar a atividade do PLS sobre os critérios macroscópicos, microscópicos e sobre o peso úmido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS.

✓ Investigar a ação do PLS sobre os níveis colônicos de MDA e GSH de ratos com colite induzida por TNBS.

✓ Avaliar o efeito do PLS sobre a concentração de MPO no cólon de ratos com colite induzida por TNBS.

✓ Verificar o papel do PLS sobre a produção de IL-1 β e TNF- α na mucosa do cólon de ratos com colite induzida por TNBS.

✓ Determinar os níveis de nitrato e nitrito na mucosa do cólon de animais com colite induzida por TNBS e tratados com o PLS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo experimental que foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Fisiofarmacologia (LAFEX), do centro de pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Vale ressaltar que o trabalho se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí sob o protocolo 023/15 conforme Anexo I.

4.1 Animais

Foram utilizados 72 ratos wistar, fêmeas, pesando entre 150 - 200 gramas com medida aproximada em 175 gramas por animal, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Piauí. Doze horas antes, em todos os experimentos, os animais foram colocados em jejum, mas com livre acesso à água. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados estavam de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

Os animais foram distribuídos em grupos experimentais (n=6) e acomodados em caixas apropriadas, em ambiente com temperatura controlada. Após jejum de 12 horas, os animais foram pesados e identificados na cauda com marcador para retroprojeter em cores de acordo com os grupos.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos de acordo com a semelhança dos pesos nos seguintes grupos:

- **Grupo Salina (SAL)** – animais submetidos a enema de 0,8ml de salina
- **Grupo Colite (TNBS)** – animais submetidos a enema de 0,8ml de solução de TNBS em etanol a 50%.
- **Grupo Colite com Polissacarídeo da alga *D. simplex* (PLS)** – animais submetidos a 0,8ml de enema de solução de TNBS e etanol a 50% e tratados com polissacarídeo (90mg/Kg), VO, uma hora antes da indução da colite, 24, 48 e 72 horas depois da indução da colite.

- **Grupo Colite com Dexametasona (DEXA)** – animais submetidos a 0,8ml de enema de solução de TNBS (80 μ L) em etanol a 50% e tratados com dexametasona (1mg/Kg), IP, uma hora antes da indução da colite, 24, 48 e 72 horas depois da indução da colite.

4.3 Padronização do modelo de Doença de Crohn experimental

4.3.1 Modelo de doença de Crohn experimental induzido por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

Inicialmente, os animais passaram por um processo de preparação do cólon. A limpeza mecânica dos cólons foi realizada por enema de 5 mL de solução salina a 0,9% aplicado por cinco segundos, através de cateter de polietileno. O modelo utilizado foi baseado no modelo de colite induzida por TNBS descrito por Morris et al (1989).

As colites foram induzidas pela administração de TNBS (20mg) diluído em etanol a 50%, sendo a solução administrada num volume de 0,8 ml por animal. O grupo controle recebeu apenas salina (0,9%, num volume de 0,4 ml). Para a indução da colite os animais foram previamente anestesiados e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi introduzido, por via retal, um cateter de polietileno nº 6 até 8 cm da margem anal para a administração das soluções. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno da solução permitindo maior tempo de contato com a mucosa cólica. Todos os experimentos foram realizados três dias após a indução das colites (Figura 3) e os tratamentos com o PLS (90 mg/kg) e dexametasona (1mg/kg) foram feitos antes e após 24, 48 e 72 horas, uma vez ao dia após a indução da colite.

Figura 3 – Indução da colite.



Fonte: GOES, 2014

Os grupos TNBS, PLS e DEXA foram submetidos a indução da colite por esse modelo. O grupo SAL passou pelo mesmo método, porém recebeu somente salina, através de enema.

4.3.2 Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos da lesão.

Os animais foram eutanasiados 3 dias após a indução das colites por deslocamento cervical. Em seguida, submetidos a laparotomia por incisão mediana. Após a identificação do reto e cólon, foi isolada uma extensão de 5 cm do cólon. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e estendida sobre uma superfície plana para uma avaliação do escore macroscópico, conforme tabela 1, seguindo a técnica descrita por Morris et al (1989).

Um segmento de 5 cm de intestino contendo área de inflamação, foi seccionado longitudinalmente, e subdividido em amostras de tecido para análises histopatológicas e bioquímicas. Para a avaliação de escores microscópicos, foi utilizada a técnica descrita por Appleyard, Wallace (1995) segundo tabela 2.

Tabela 1 – Escores macroscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal.

Critério	Escore
Aparência normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espessamento da parede colônica	2
Ulceração com inflamação em um sítio	3
Ulceração / inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon	5
Área de lesão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon. A quantificação é aumentando em 1 para cada centímetro adicional.	6 – 10

Fonte: MORRIS et al, 1989

Tabela 2 - Escores microscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal.

Critério	Escore
Perda da arquitetura da mucosa	0 – 3
Infiltração celular	0 – 3
Espessamento da muscular	0 – 3
Formação de abscesso em cripta	0 – 1
Ausência de células caliciformes	0 – 1

Fonte: APPELYARD, WALLACE, 1995

Para a avaliação dos escores microscópicos foram confeccionadas lâminas que seguiram o protocolo conforme descrito em Apêndice A. Após 24 horas da montagem das lâminas, as mesmas foram levadas ao microscópio para análise que foi realizada por histologista que desconhecia a que grupo pertencia o animal estudado.

4.3.3 Avaliação do peso úmido dos cólons de animais com ou sem colite.

Antes da análise macroscópica dos escores de lesão dos cólons de animais com ou sem colite e tratados com o PLS (90 mg/kg) e com dexametasona (1mg/kg) foram retirados fragmentos de cólon medindo 5 cm de comprimento cada. Posteriormente, realizou-se a pesagem desses fragmentos e os resultados foram expressos pela unidade peso úmido / cm de lesão.

4.4 Ensaios Bioquímicos

4.4.1 Avaliação da Atividade da MPO

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Uma porção do intestino foi coletada e incubada em 200 μ L de tampão gelado (NaCl 0,1 M + EDTA 0,015 M/L de NaPO₄ 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, foram homogeneizados num Politron (13000 rpm) e centrifugado por 12 minutos a 4500 rpm em uma centrifuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente foi centrifugado nas mesmas condições e no mesmo tampão. O sobrenadante foi, mais uma vez, retirado e, então, o precipitado foi homogeneizado novamente (Politron - 13000 rpm) em um outro tampão (HTAB (0,05%)/200 ml de NaPO₄ 0,05M. A próxima etapa foi a de colocar esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2X).

Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi pipetado numa placa (5-10 μ l) e foram acrescentados nessa placa 45 μ l de NaPO₄ 0,08M junto com a solução de leitura (TMB 25 μ + H₂O₂ 100 μ l). A reação terminou com o acréscimo de H₂SO₄ 50 μ l (4M) e leitura em um leitor de placa a 450nm. A análise dessa enzima seguiu o protocolo estabelecido por (BRADLEY et al.,1982). O resultado foi expresso como sendo UMPO/mg de tecido.

4.4.2 Dosagem de TNF- α e IL-1 β no tecido intestinal.

Os animais tiveram amostras de intestino retirados 72 horas após a indução da colite para dosagem de citocinas e estocadas em freezer -70°C até o momento do ensaio. A detecção das concentrações de TNF- α e IL-1 β foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os fragmentos foram adicionados em um tampão inibidor de protease (500 μ L de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogenizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e incubado com 2 μ g/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 μ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi lavada com PBS -Tween 20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução.

Em seguida, a placa foi incubada com a curva padrão das citocinas (TNF- α e IL-1 β) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do intestino a serem dosados, 100 μ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado (1:1000) diluído em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidina peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada e incubada com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 μ L por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que varia de 5 a 20 minutos dependendo da citocina. A reação foi parada com 150 μ L por poço de H₂SO₄ 1M. A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram expressos como média \pm EPM da quantidade de TNF – α e IL - 1 β em pg/ml (TAVARES-MURTA, et al., 2008).

4.4.3 Ensaio para dosagem de MDA

Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos da mucosa foram homogeneizados com KCl gelado 1,15% para o preparo de 10% de homogenato. Duzentos e cinquenta (250 μ l) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml. Acrescentou-se a esse

homogenato 1,5 de H_3PO_4 (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 15 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mol de MDA/g de tecido.

4.4.4 Ensaio para dosagem de GSH

A glutathiona reduzida é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos. Ele exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER, 1991).

O método de Sedlak, Lindsay (1968) foi utilizado para análise de glutathiona nas amostras. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa intestinal dos animais foi homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 μ L do homogeneizado foram misturadas a 320 μ L de água destilada e a 80 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400 μ L do sobrenadante foi adicionado 800 μ L de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 μ L de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em μ g de GSH/g de tecido.

4.4.5 Determinação de nitrato e nitrito na mucosa intestinal

Para a determinação das concentrações colônicas de nitrato e nitrito através do método de Griess (GREEN et al.,1982) foi, inicialmente, preparada uma solução contendo 0,5 unidades por ml de nitrato redutase (Sigma) em um tampão KH_2PO_4 contendo NADPH. Para o preparo da reação de Griess foi armazenada separadamente a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz, uma solução contendo Sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 a 2,5% e outra solução de NEED a 0,1% em H_3PO_4 a 2,5%. Depois de preparadas as soluções, amostras processadas de tecido colonico de animais com colite e

tratados com o PLS (90 mg/kg) e com dexametasona (1mg/kg) foram incubadas numa microplaca com nitrato redutase (0,016 L por poço) durante 12 h para a conversão de NO₃ (nitrato) em NO₂ (nitrito). A produção de óxido nítrico foi determinada medindo as concentrações de nitrito em um leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Griess. Os resultados foram expressos como micromoles (µM) de nitrito.

4.4.6 Análise Estatística

Os dados paramétricos (escores macroscópicos, peso úmido, MDA, GSH, MPO, IL-1β, TNF-α, nitrato e nitrito) foram expressos na forma de mediana (mínimo - máximo) e sua análise foi realizada por meio do teste de Newman-Keuls. Para a análise dos escores microscópicos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A significância estatística foi aceita quando $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6.01, assinalando com um asterisco (*) os valores significantes quando comparados ao grupo TNBS e uma cerquilha (#) quando comparados ao grupo salina. Os dados paramétricos foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média (E.P.M.).

5 RESULTADOS

5.1 Escores macroscópicos

O escore macroscópico de atividade inflamatória segundo Morris et al (1989) foi aplicado nas amostras de intestino coletadas após três dias de indução da colite ($p < 0,05$). O gráfico 1 mostra os valores dos escores macroscópicos de lesão dos cólons intestinais (eixo vertical) calculados para cada grupo experimental que são os grupos SAL, TNBS, PLS com dosagens de 30, 60, 90 mg/kg e DEXA 1 mg/kg (eixo horizontal). Analisando este gráfico verifica-se que os animais submetidos a colite por TNBS ($16,60 \pm 2,06$ escores de lesão) apresentaram aumento na pontuação desses escores em relação ao grupo salina ($1,20 \pm 0,37$ escores de lesão). Os animais com colite induzida tratados com PLS 30, 60 e 90 mg/Kg, v.o. (30 mg/Kg: $4,80 \pm 0,73$ escores de lesão; 60 mg/Kg: $2,75 \pm 1,18$ escores de lesão; 90 mg/Kg: $2,40 \pm 0,97$ escores de lesão) reduziram os danos macroscópicos de lesão no tecido colônico com efeito máximo observado com a dose de 90 mg/Kg. Efeitos semelhantes aos produzidos por dexametasona ($5,50 \pm 1,65$ escores de lesão), uma droga de escolha para o tratamento de DIIs.

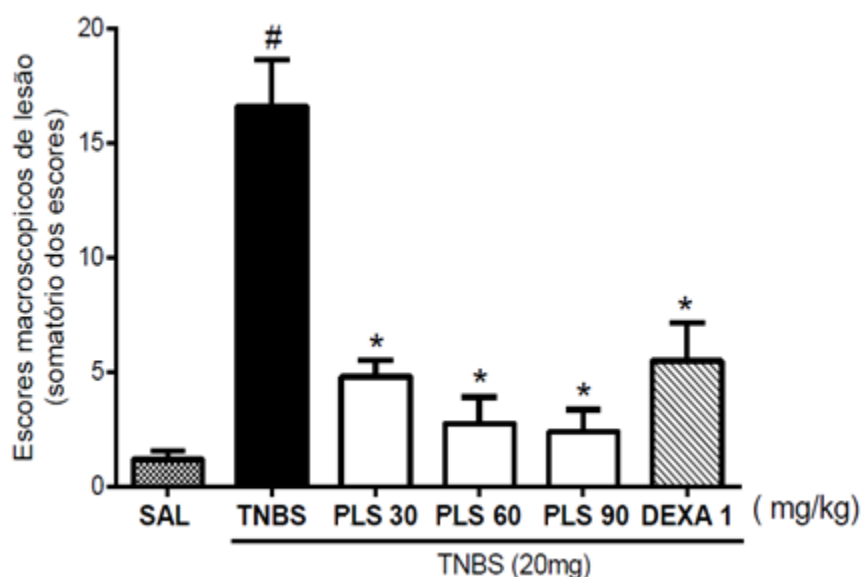


Gráfico 1 - Escores macroscópicos dos cólons intestinais no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida com TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (30, 60 e 90 mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, IP), a cada 24 horas por três dias. O controle utilizado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). Ao fim do terceiro dia, os animais foram submetidos a eutanásia e tiveram 5 cm da porção distal do seu intestino grosso coletado para avaliação macroscópica, conforme Morris et al (1989). Os animais submetidos ao TNBS tiveram diferença estatística com elevação dos escores de Morris em comparação ao grupo salina ($p < 0,05$). Os animais com colite induzida tratados com PLS e DEXA

apresentaram diferença estatística nos escores macroscópicos em relação ao grupo TNBS. Os resultados são expressos em média \pm EPM dos escores macroscópicos de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

5.2 Peso úmido

O gráfico 2 mostra a avaliação do peso úmido medida em mg de peso úmido por cm de lesão dos grupos SAL, TNBS, PLS 90 mg/kg v.o. e DEXA 1 mg/kg. Observou-se aumento com significância estatística do peso úmido dos cólons 72 horas após a indução da colite com TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema) ($0,95 \pm 0,06$ g) quando comparado ao grupo salina ($0,26 \pm 0,01$ g). Houve reversão significativa da lesão nos animais pré tratados uma hora antes da indução da colite, 24, 48 e 72 horas após a indução da colite, com PLS (90mg/kg, v.o., por 3d) ($0,44 \pm 0,03$ g) e DEXA (1mg/Kg, IP, 3d) ($0,51 \pm 0,04$ g) quando comparados ao grupo TNBS ($p < 0,05$).

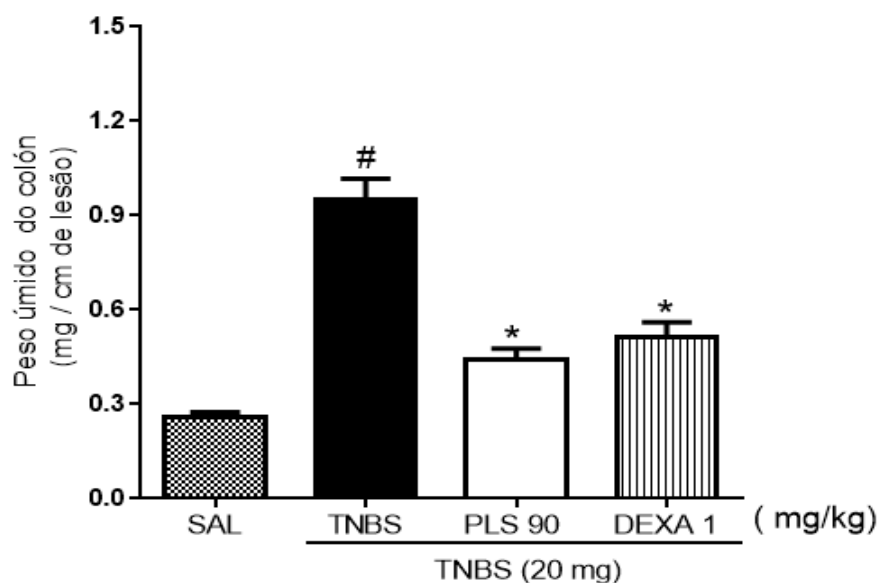


Gráfico 2 – Avaliação do peso intestinal úmido no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida com TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, IP), a cada 24 horas por três dias. O controle utilizado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). Ao fim do terceiro dia, os animais foram submetidos a eutanásia e tiveram 5 cm da porção distal do seu intestino grosso coletado para aferição do peso úmido. Ratos submetidos ao TNBS tiveram elevação significativa do peso úmido intestinal quando comparado ao grupo salina, efeito este, prevenido pelo tratamento com PLS e DEXA. Os resultados são expressos em média \pm EPM dos escores macroscópicos de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

5.3 Escores histopatológicos

O escore microscópico de atividade inflamatória segundo Appleyard, Wallace (1995) foi aplicado às lâminas de intestino coradas com HE. Observando as imagens da figura 4 e os valores dos escores descritos na tabela 3, verifica-se que os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema) apresentaram aumento na pontuação desses escores em relação ao grupo salina ($p < 0,05$), e essa significância deveu-se principalmente à perda de arquitetura mucosa e ao infiltrado celular (tecido conjuntivo principalmente) (Figura 4b). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com PLS (90mg/Kg), por três dias ou DEXA (1mg/Kg) por três dias, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS ($p < 0,05$), em valores semelhantes ao grupo salina. (Figura 4c) (Figura 4d) (Figura 4b).

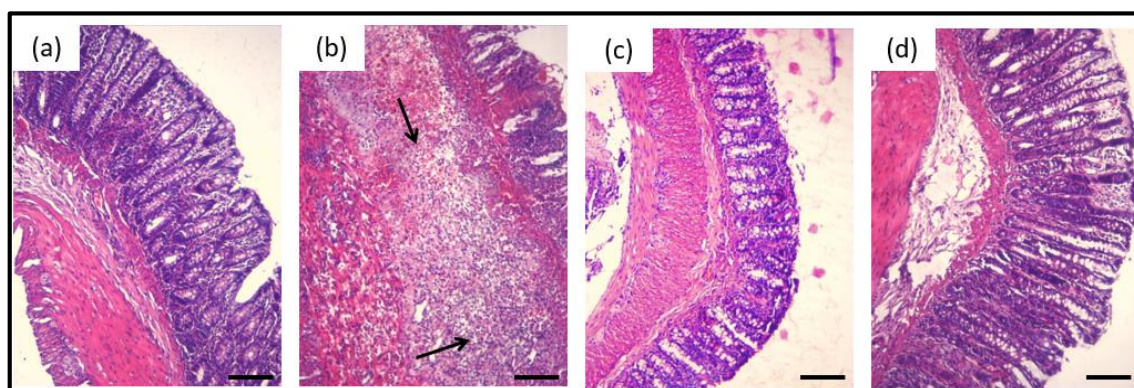


Figura 4 – A fração de polissacarídeo extraído da alga *Digenea simplex* melhora as alterações histopatológicas em colite induzida por TNBS. Fotomicrografia (150X, escala 50 μ m) de cólon de ratos controle (a), TNBS (b), TNBS + PLS (90 mg/kg, v.o.) (c) e TNBS + DEXA (1 mg/kg, i.p.) (d), respectivamente. Pode-se observar que a indução por TNBS resulta em perda da arquitetura da mucosa, intensa infiltração celular (b, seta). O tratamento com *D. simplex* foi capaz de reverter estas alterações.

Parâmetros histológicos	Escore Médio			
	SAL	TNBS	TNBS + PLS	TNBS + DEXA
Perda da arquitetura da mucosa	0 (0-1)	3 (2-3) #	0 (0-1) *	1 (0-1) *
Infiltração celular	0 (0-1)	3 (2-3) #	1 (0-1) *	1 (0-1) *
Espessamento da muscular	0 (0-1)	3 (2-3) #	0 (0-1) *	1 (0-1) *
Abcesso de cripta	0 (0-0)	1 (1-1) #	0 (0-1) *	0 (0-1) *
Depleção de células caliciformes	0 (0-0)	1 (1-1) #	0 (0-0) *	0 (0-1) *
Escore Total de danos	0	11	1	3

Tabela 3 – Escores microscópicos no intestino, no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida com TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com o Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, IP), a cada 24 horas por três dias. O controle utilizado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). Na avaliação das lâminas coradas pelo método H-E, foi realizado análise microscópica conforme Appleyard, Wallace (1995). Os animais dos grupos PLS e DEXA apresentaram diferença

estatisticamente significativa em relação ao grupo TNBS. Os resultados dos escores histológicos são expressos em média \pm EPM (n = 6) * $p < 0,05$ vs grupo salina; # $p < 0,05$ vs grupo TNBS (Kruskal-Wallis/Teste de Dunn).

5.4 Infiltração neutrofílica no cólon – Atividade da MPO

A avaliação da atividade da enzima MPO em UMPO/mg de tecido dos grupos SAL, TNBS e PLS 90 mg/kg está expressa no gráfico 3.

A avaliação da infiltração neutrofílica foi mensurada a partir da atividade da MPO. Após três dias de indução da colite, amostras dos cólons foram submetidas a ensaio para determinação da atividade de MPO. Os animais submetidos à colite por TNBS apresentaram aumento na infiltração de neutrófilos ($18,84 \pm 5,224$ unidades de MPO/mg de tecido colônico) em relação ao grupo de animais tratados com PLS (90m/Kg), por três dias ($1,908 \pm 1,559$ unidades de MPO/mg de tecido colônico).

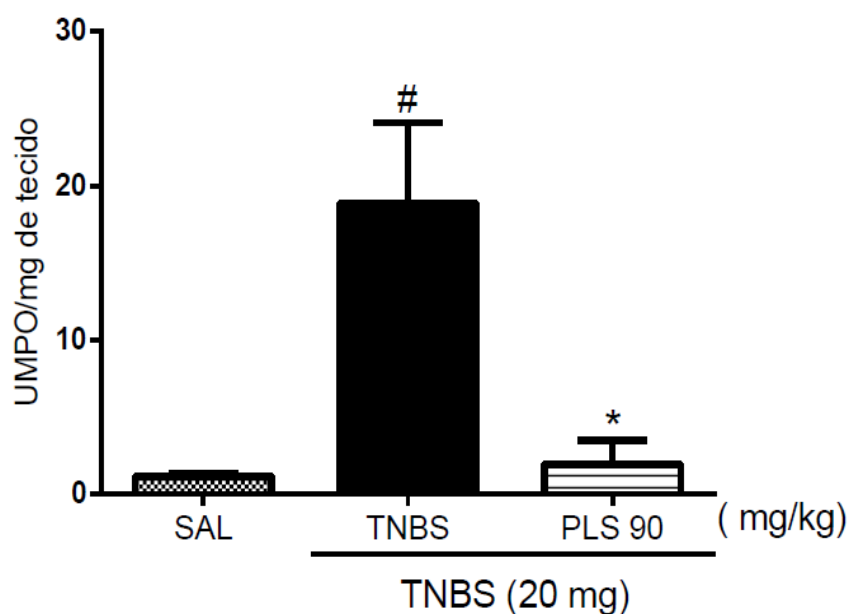


Gráfico 3 – Atividade da MPO no intestino no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com o Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias. O controle utilizado foi salina (SAL) (0,8 ml, por enema). Amostras dos cólons foram submetidas a ensaio para determinação da atividade de MPO. Os animais do grupo TNBS apresentaram aumento na infiltração de neutrófilos para o cólon em relação ao grupo SAL (* $p < 0,05$). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com PLS (90m/Kg), por três dias apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

5.5 Concentração de MDA no intestino

No gráfico 4 pode-se observar a avaliação da atividade de MDA em nmol/g de tecido dos grupos SAL, TNBS e PLS 90 mg/kg.

Após três dias de indução da colite, a concentração de MDA foi mensurada nas amostras dos tecidos. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema) apresentaram aumento ($p < 0,05$) na concentração ($162,5 \pm 25,63$ nmol/g de tecido) de MDA no cólon em relação ao grupo salina ($65,07 \pm 17,93$ nmol/g de tecido). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com PLS (90mg/Kg) inibiu o aumento de MDA ($15,91 \pm 2,249$ nmol/g de tecido) no tecido da mucosa inflamada.

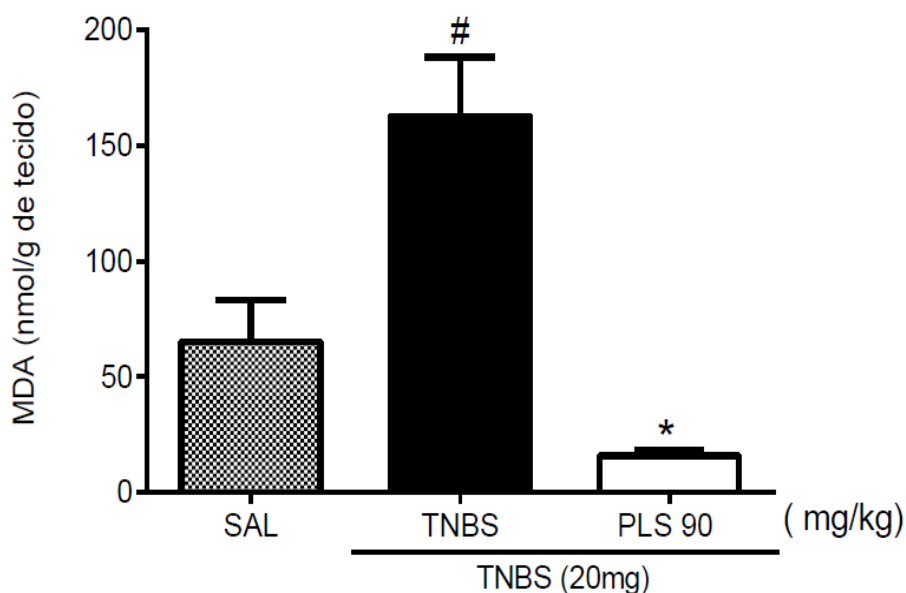


Gráfico 4 – Concentração de MDA no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com o Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, v.o.) a cada 24 horas por três dias. O controle utilizado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). A concentração de MDA foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia e comparadas com os controles. Os animais que foram submetidos ao TNBS aumentaram significativamente a concentração de MDA, comparado ao grupo salina, esse efeito foi inibido pela ação de PLS. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

5.6 Concentração de GSH no intestino

O gráfico 5 mostra a avaliação da atividade de GSH em mg/g de tecido dos grupos SAL, TNBS e PLS 90 mg/kg.

Após três dias de indução da colite, a concentração de GSH foi mensurada nas amostras dos tecidos. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema) apresentaram redução na concentração ($p < 0,05$) de GSH no cólon ($91,56 \pm 14,96$ mg/g de tecido) em relação ao grupo salina ($240,2 \pm 18,55$ mg/g de tecido). O tratamento durante 3 dias com PLS na dose de 90 mg / kg de evitou o consumo de GSH ($268,2 \pm 17,62$ mg/g de tecido), o qual se manteve a uma concentração muito mais elevada quando comparada com o grupo controle TNBS.

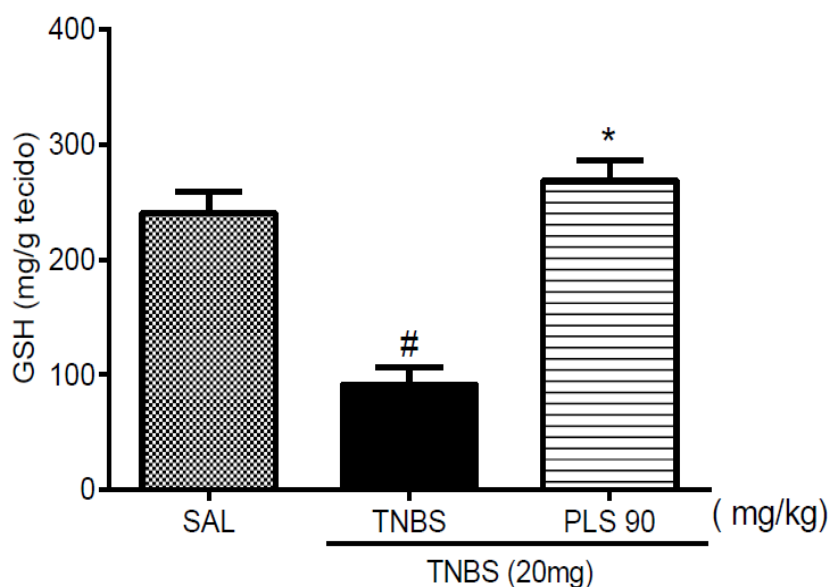


Gráfico 5 – Concentração de GSH no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com o Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias. O controle utilizado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). A concentração de GSH foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia e comparadas com os controles. Os animais que foram submetidos ao TNBS reduziram significativamente a concentração de GSH, comparado ao grupo salina. O grupo PLS aumentou significativamente o nível de GSH, comparado ao grupo TNBS. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

5.7 Dosagem de Nitrato e Nitrito

A avaliação das dosagens de nitrato e nitrito em μM nos grupos SAL, TNBS e PLS 90 mg/kg está representada no gráfico 8.

A concentração de nitrato e nitrito foi mensurada, após três dias de indução da colite, nas amostras dos cólons. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (0,8mL, por enema) apresentaram aumento na concentração ($0,6638 \pm 0,045 \mu\text{M}$) de nitrato e nitrito no cólon em relação ao grupo salina ($0,2907 \pm 0,012 \mu\text{M}$). O tratamento de PLS reduziu os níveis de nitratos e nitrito de ($0,3218 \pm 0,014 \mu\text{M}$) no dano intestinal causado por TNBS no cólon ($p < 0,05$).

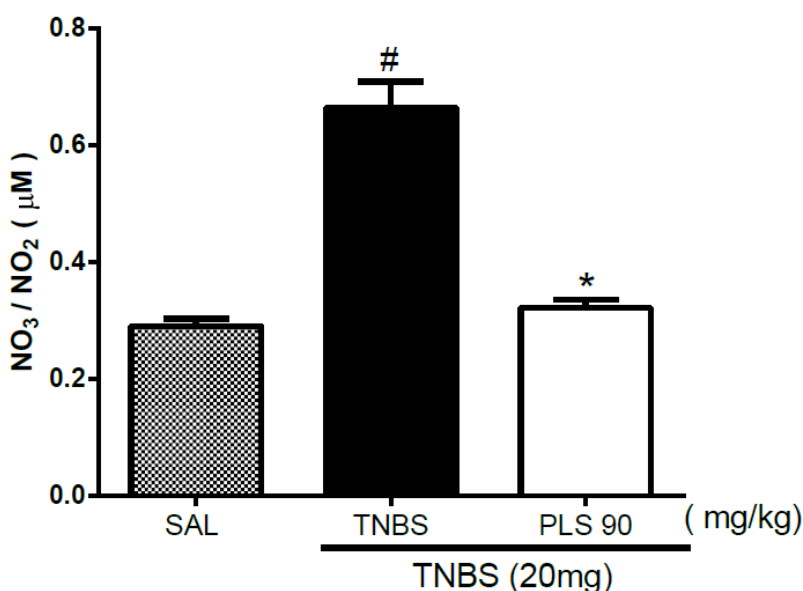


Gráfico 6 - Avaliação da concentração de Nitrato e Nitrito no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias. O controle usado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). A concentração de nitrato e nitrito foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia de indução da colite e comparadas com o grupo TNBS. Ratos submetidos ao TNBS aumentaram significativamente a concentração de nitrato e nitrito, comparado ao grupo salina e no grupo PLS reduziram significativamente. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

5.8 Dosagem da citocina IL-1 β

Pode-se observar no gráfico 6 a avaliação da atividade da citocina IL-1 β em pg/ml de tecido dos grupos SAL, TNBS e PLS 90 mg/kg.

A concentração de IL-1 β foi mensurada, após três dias de indução da colite, nas amostras dos cólons. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (0,8mL, por enema) apresentaram aumento na concentração de IL-1 β ($6630,0 \pm 561,5$ pg/ml) no cólon em relação ao grupo salina ($187,4 \pm 31,65$ pg/ml). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com PLS (90mg/Kg) por três dias, apresentaram redução significativa ($2899,0 \pm 861,3$ pg/ml) da citocina.

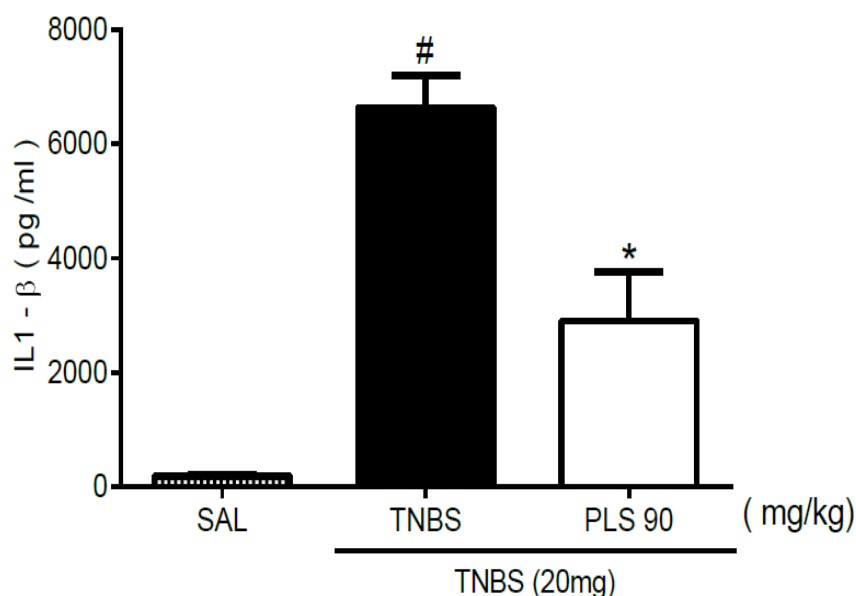


Gráfico 7 – Avaliação da concentração de IL-1 β no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias. O controle usado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). A concentração de IL-1 β foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia de indução da colite e comparadas com o grupo TNBS. Ratos submetidos ao TNBS aumentaram significativamente a concentração de IL-1 β , comparado ao grupo salina, esse efeito foi inibido pela ação de PLS. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

5.9 Dosagem da citocina TNF – α

No gráfico abaixo observa-se a avaliação da atividade da citocina TNF – α em pg/ml de tecido dos grupos SAL, TNBS e PLS 90 mg/kg.

A concentração de TNF- α foi mensurada, após três dias de indução da colite, nas amostras dos cólons. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (0,8mL, por enema) apresentaram aumento na concentração de TNF- α ($104,3 \pm 21,54$ pg/ml) no cólon em relação ao grupo salina ($26,99 \pm 7,771$ pg/ml). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com PLS (90mg/Kg) por três dias, apresentaram redução na concentração ($16,74 \pm 10,60$ pg/ml) da citocina ($p < 0,05$) (Gráfico 7).

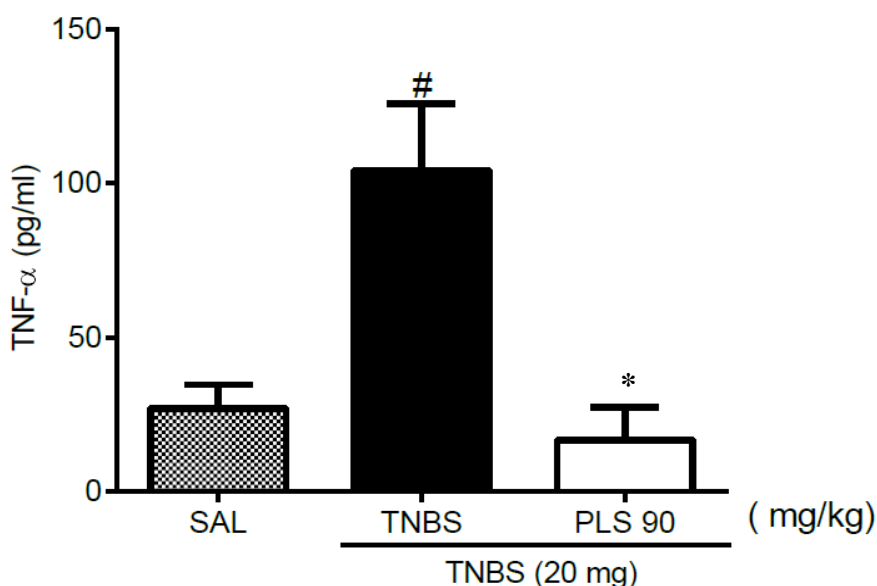


Gráfico 8 – Avaliação da concentração de TNF - α no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (0,8ml, por enema), foram tratados com foram tratados com Polissacarídeo sulfatado da Alga *Digenea simplex* (PLS) (90mg/Kg, VO) a cada 24 horas por três dias. O controle usado foi salina (SAL) (0,8ml, por enema). A concentração de TNF - α foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia de indução da colite e comparadas com o grupo TNBS. Ratos submetidos ao TNBS aumentaram significativamente a concentração de IL-1 β , comparado ao grupo salina, e no grupo PLS reduziram significativamente. Os resultados são expressos em média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo TNBS; # $p < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

6 DISCUSSÃO

As Doenças inflamatórias intestinais (DIIs) descrevem condições inflamatórias crônicas e recidivantes do trato intestinal. Comumente estuda-se dois tipos de DIIs, que são a Doença de Crohn (DC) e Retocolite ulcerativa (RCU). A DC é caracterizada por uma inflamação ao longo de todo o trato gastrointestinal, com lesões mais comumente encontrados no intestino delgado e cólon proximal. Aproximadamente 60% dos pacientes com DC têm envolvimento do cólon, com apenas 20% portadores de doença do cólon isolado. Na DC, a inflamação é transmural, atravessando várias camadas do intestino, e, tipicamente, ocorre de forma descontínua (KRAAK, GROS, BEAUCHEMIN, 2015).

A fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais envolve múltiplos fatores: infecciosos, ambientais, genéticos e respostas imunológicas anormais. Há fortes evidências que, nessa situação, a resposta inflamatória na mucosa intestinal se caracteriza por aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, com descontrole na ativação imune (GOES, 2014).

Diversos ensaios clínicos têm utilizado fitoterápicos no tratamento das DIIs. Na DC as ervas terapêuticas exercem o seu benefício terapêutico por diferentes mecanismos, os quais incluem regulação imune e atividade antioxidante. A *Cannabis sativa* é a planta conhecida como maconha, e possui efeitos benéficos nos processos inflamatórios, podendo apresentar efeito terapêutico nas DIIs através da inibição da inflamação do cólon por meio do sistema canabinóide endógeno (XANTHOS et al, 2015).

Outro estudo mostrou que plantas a base da fórmula FAHF-2 tem sido muito utilizadas na medicina tradicional chinesa para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, incluindo a colite. Foram comprovados efeitos anti-inflamatórios de plantas a base da fórmula FAHF-2 em DIIs experimentais e humanas, sendo eles: diminuição da produção de TNF- α , diminuição da colite progressiva em modelos animais, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. A fórmula FAHF-2 teve um efeito imunomodulador na mucosa do cólon inflamado. Os resultados sugerem que FAHF-2 pode ter um efeito benéfico sobre o perfil imunológico relacionado com a DC (SONG et al, 2014).

Vários são os fatores descritos como causadores de doenças inflamatórias intestinais. Na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessas doenças foram desenvolvidos vários modelos de doenças inflamatórias intestinais. Esses modelos de colite experimental servem como ferramentas para a avaliação pré-

clínica da eficácia de novos tratamentos. Eles exibem algumas das características fenotípicas e fisiopatológicas das DIIs humanas. No presente estudo, foi utilizado o modelo de colite induzida pela administração de solução de TNBS em etanol a 50% em ratos Wistar. A indução da colite feita a partir da administração colônica de TNBS em solução de etanol é um modelo de fácil indução, baixo custo, razoavelmente reprodutível e pode ser aplicado em ratos, coelhos e camundongos. Nesse modelo, o etanol quebra a integridade epitelial permitindo a penetração do TNBS, com consequente desenvolvimento da colite com características semelhante às DIIs. Nesse contexto, tem-se estudado as DIIs em modelos de animais na tentativa da elucidação da fisiopatologia da DC e para testar novas terapias (MORRIS et al, 1989).

Durante o processo inflamatório ocorre migração de leucócitos e de células fagocíticas para o sítio da lesão. A migração leucocitária, processo no qual as células são atraídas para o tecido lesado, denomina-se quimiotaxia. Várias células estão envolvidas nesta fase da resposta inflamatória, dentre elas as fagocíticas que são constituídas principalmente por neutrófilos. Caso a inflamação persista, ocorre também na área lesada uma infiltração de células do tipo mononucleares incluindo-se macrófagos e monócitos. As citocinas são mediadores extremamente importantes na resposta inflamatória (CUNHA, 2012).

Ainda segundo Cunha (2012), as citocinas são pequenas proteínas, com peso molecular de 8 a 40 kDa, que podem ser produzidas em todos os tecidos e pela maioria das células dos sistemas imune inato e adaptativo. Dentre as diversas citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α possui um importante papel inicial na resposta inflamatória. Essa citocina é um potente ativador de neutrófilos mediando a quimiotaxia, além de ser capaz de causar alterações de permeabilidade vascular. A IL-1 β é uma citocina presente na resposta imune inata. É produzida por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e outras citocinas como o TNF- α .

Vários estudos da literatura vêm propondo que uma das hipóteses para a instalação da fisiopatologia da Doença de Crohn é a falha na produção de substâncias pró-inflamatórias agudas responsáveis por atraírem neutrófilos para o foco da infecção. Dentre essas substâncias, estão as citocinas, como por exemplo, a IL-1 β e o TNF- α . A liberação dessas citocinas por macrófagos é essencial para a ativação e atração neutrofílica para o local da lesão tecidual e para o início do combate contra a proliferação da doença (STROBER, FUSS, BLUMBERG, 2002). Outro dado da literatura mostrou que pacientes com Doença de Crohn apresentavam falha na migração de neutrófilos não

só para o foco da infecção, mas também para uma região distante do foco primário da lesão (cólon) e que essa falha viria associada também com a diminuição da produção de citocinas, como por exemplo, a IL-10 (MARKS et al., 2006).

Estudos mostraram que outras terapias alternativas também podem auxiliar no tratamento da DC. Foi demonstrado que moxabustão e a acupuntura são tratamentos eficazes e seguros, porém, o seu mecanismo terapêutico ainda não foi completamente esclarecido. Em um ensaio realizado em pacientes com DC comprovou-se que esses tratamentos restauraram o equilíbrio entre células intestinais aliviando a inflamação e recuperando a função intestinal (ZHAO et al, 2015).

O Fucoidan é um produto natural marinho, pertencente a uma classe de polímeros ricos em fucose. Estudos mostraram que os fucoidans exibem múltiplas bioatividades incluindo efeitos anti-inflamatórios potentes. Em modelo de colite induzida por DSS, os ratos foram tratados uma vez por dia durante 7 dias, com fucoidanos via oral. O quadro clínico da doença foi monitorado diariamente e pôde-se observar redução de edema, diminuição nos danos do cólon e infiltração das células inflamatórias, com redução na produção de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com fucoidan oral reduziu significativamente a inflamação na colite induzida por DSS, e, portanto, poderia representar uma nova opção terapêutica para a doença inflamatória intestinal (LEAN et al, 2015).

Muitas algas marinhas e seus componentes isolados demonstraram propriedades terapêuticas benéficas, incluindo analgésicos, anti-inflamatórios e ações gastroprotetoras (BRITO et al, 2014; PEREIRA et al, 2014).

O primeiro parâmetro inflamatório avaliado foi a macroscopia. Trata-se de um modelo experimental utilizado para se avaliar a resposta inflamatória.

Os critérios macroscópicos de lesão são importantes parâmetros para se avaliar a DC devido a mesma apresentar características peculiares tais como: presença de áreas avermelhadas, espessadas, com exsudato, além de áreas de intestino lesado separadas por áreas de intestino com aparência macroscopicamente normal, chamadas áreas salteadas, são encontradas comumente (ARAÚJO et al, 2011). Os resultados desse estudo mostraram inicialmente que o polissacarídeo extraído da alga *D. simplex* possui eficácia contra os danos causados pelo TNBS na colite em ratos, pois o grupo PLS apresentou redução significativa dos escores macroscópicos nos ratos examinados. De acordo com estes resultados pode-se inferir que o PLS produz efeito anti-inflamatório em colite induzida por TNBS em ratos.

Nesse estudo pode-se perceber que nos animais do grupo TNBS ocorreu aumento nas alterações microscópicas confirmando aquelas observadas nos parâmetros macroscópicos. Os animais apresentaram principalmente perda de arquitetura da mucosa e presença de infiltrado celular quando comparados com os outros grupos em estudo. No grupo de animais tratados com PLS houve uma redução dessas alterações, confirmando que o polissacarídeo da alga *Digenea simplex* reverteu a inflamação.

Os dados apresentados corroboram com o estudo em que a colite induzida por TNBS e tratada com o polissacarídeo da alga *Gracilaria birdiae* produziam a redução dos parâmetros microscópicos (BRITO et al, 2014). As alterações macroscópicas e microscópicas estão associadas com a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (LEAN et al, 2015).

Um estudo realizado com o bioproduto não marinho conhecido como absinto, demonstrou que 20 pacientes com a DC ativa ao receberem pó seco de absinto, revelou que após 6 semanas de tratamento, 80% dos pacientes alcançaram melhora da Doença de Crohn. Outro achado revelou que estudos clínicos pilotos realizados com *Boswellia serrata* verificaram seu potencial no tratamento das DIIs. Em um estudo realizado com 102 pacientes, constatou-se que em média 90 pacientes apresentaram redução média na DC ativa (XANTHOS et al 2015).

Foi verificado que os animais do grupo TNBS tiveram aumento significativo do peso úmido de seus cólons enquanto que os animais do grupo PLS apresentaram redução desse parâmetro, indicando diminuição do peso úmido. O peso úmido do tecido do cólon inflamado é considerado um indicador macroscópico da gravidade e a da extensão da resposta inflamatória. Ele reflete a magnitude do edema e infiltrado celular no tecido estudado (BUSSEROLLES et al., 2005).

Foram propostos protocolos que avaliassem a influência das colites sobre a migração de células inflamatórias, como por exemplo, a Mieloperoxidase (MPO), que avaliou a migração de neutrófilos para o cólon dos grupos em estudo.

A fração do PLS diminuiu a atividade da MPO. A MPO é a principal enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (CRUZ, 2010). A enzima MPO é utilizada como marcador da infiltração neutrofílica, da inflamação e da lesão tecidual nos tecidos gastrointestinais (MARCELINO, 2012). A redução da MPO no grupo PLS confirmada pela diminuição dos danos na mucosa reafirma os resultados dos parâmetros microscópicos, que apresentou reversão da infiltração neutrofílica. Demonstrando a função do polissacarídeo, dados na literatura mostram que o polissacarídeo da alga

Agardhiella ramosissima testada como anti-inflamatória apresentou redução da infiltração neutrofílica através da diminuição dos níveis da enzima MPO.

Na resposta inflamatória a patógenos e a injúrias teciduais por estímulos químicos e físicos uma das características principais é o recrutamento de células polimorfonucleadas para o foco da inflamação. Após serem ativadas por substâncias inflamatórias, os neutrófilos produzem citocina, que atraem outros neutrófilos e outras células do sistema imune (DAL SECCO et al., 2006).

O recrutamento e ativação dos neutrófilos durante o processo inflamatório contribui para o aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio sobrecarregando os mecanismos de proteção antioxidante dos tecidos elevando com isso, a inflamação do cólon. O estresse oxidativo tem mostrado forte relação com a patogênese da doença inflamatória intestinal (CUZZOCREA et al., 2001).

Segundo Ciacci et al (2013), a fruta kiwi possui alto teor de compostos antioxidantes e recentemente foram relatadas propriedades anti-inflamatórias. O peptídeo kissper presente no kiwi foi testado em modelos intestinais humanos e verificou-se seu efeito protetor no intestino humano. Este estudo revela que não somente produtos marinhos possuem efeitos benéficos nas DIIs.

Os compostos antioxidantes desempenham um importante papel em várias condições patológicas, incluindo a inflamação, doenças neurodegenerativas e câncer. Na literatura foi relatado que os PLSs possuem atividade antioxidante, tais como os extraídos de algas marinhas, protegem contra a morte celular devido à sua capacidade em degradar espécies reativas de oxigênio excessivas (COSTA et al, 2010).

A colite induzida por TNBS experimentalmente aumenta a produção de peroxidação lipídica. Os radicais livres de oxigênio podem provocar distúrbios nos sistemas biológicos por afetarem uma variedade de seus constituintes moleculares (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA). Resíduos de ácidos graxos poli-insaturados nas proteínas apresentam uma estrutura química que os torna alvo particularmente vulneráveis para a oxidação pelos radicais livres (peroxidação de lipídios) (PAIVA, 2004).

Durante a inflamação que ocorre na DC, o MDA, que é o produto final da peroxidação lipídica, é produzido por conta da infiltração neutrofílica que foi atraída pela ação das citocinas ocorre a produção dos radicais livres por conta dos danos teciduais resultantes da inflamação (PAIVA, 2004). O MDA possui ação genotóxica e citotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias relacionadas com o estresse

oxidativo (ANTUNES et al., 2008). Os resultados demonstraram em primeiro lugar que o PLS reduziu concentrações de MDA na mucosa colônica inflamada quando comparado ao grupo TNBS. Estes resultados sugerem que o efeito gastroprotetor do PLS pode ser secundário a uma diminuição na produção de radicais livres, o que indica a possibilidade de atividade antioxidante nesta alga marinha. Portanto, os polissacarídeos sulfatados podem ser novos agentes terapêuticos por inibir os danos causados por radicais livres em excesso.

Além do MDA foram analisados os níveis de GSH, pois este é considerado o principal antioxidante intracelular, está presente na maioria das células, sendo fundamental em diversas funções biológicas, minimizando o estresse oxidativo, levando a remoção de hidroperóxidos e auxiliando na estabilização das membranas biológicas (PANJAMURTHY et al., 2005). O GSH pode ser considerado um dos agentes mais importantes no sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

A GSH constitui um dos principais mecanismos citoprotetores contra a formação de úlceras, atua como um antioxidante importante na manutenção da integridade da mucosa mantendo os grupos sulfidrílica (-SH) reduzidos e impedindo-os de reagir com radicais (CNUBBEN et al, 2001). O dano oxidativo no tecido do cólon é um potencial etiológico ou fator desencadeador de DII, porque os efeitos prejudiciais de moléculas reativas de oxigênio têm sido bem estabelecido no processo de inflamação (PAVLICK et al, 2002). De acordo com estudos prévios foi demonstrado que radicais livres citotóxicos e níveis baixos de compostos sulfidrílicos estão associados com danos teciduais gástricos (PAIVA, 2004).

Nesse estudo, observou-se altos níveis de GSH no grupo PLS quando comparados ao grupo TNBS. Esses dados sugerem que grande quantidade de GSH foi produzida no grupo PLS, levando a uma diminuição no dano na mucosa. Reforçando este resultado, em um estudo com o polissacarídeo da alga *Hypnea musciformis*, foi demonstrado que após a indução de danos gástricos a mesma apresentou efeito protetor reduzindo os níveis de MDA e aumentando os níveis de GSH (DAMASCENO et al, 2013).

O óxido nítrico é um radical livre com reatividade moderada. A sua produção em grandes quantidades através da regulação positiva de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) pode inibir enzimas-chave da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (PACHER, BECKMAN, LIAUDET, 2007). Além disso, níveis elevados de óxido nítrico a partir de iNOS ativado são tóxicos e podem danificar o tecido diretamente através da

formação de peroxinitrito após a reação com superóxido (KOLIOS, VALATAS, WARD, 2004). Produtos de sua oxidação, nitritos e nitratos, são os principais metabólitos que podem ser usados como indicadores da produção de óxido nítrico (ON) (ORIDA, LAI, 2000).

Recentemente um estudo com colite induzida por TNBS utilizou o PLS extraído da alga *Gracilaria birdiae*, e mostrou que a mesma reduziu os produtos de degradação do ON (NO_3/NO_2) (BRITO et al, 2014). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o grupo tratado com o PLS da alga *D. simplex* apresentou redução na concentração de nitrato e nitrito na mucosa intestinal de ratos com colite induzida por TNBS. Assim, pode-se inferir que o PLS tem ação anti-inflamatória contra a lesão intestinal, diminuindo a formação de radicais livres.

Drogas como corticosteroides, aminosalicilatos e imunossupressores que visam diminuir a inflamação, mostram eficácia limitada a longo prazo e estão associados com efeitos colaterais significativos. Fucoïdan é um produto natural marinho pertencente a uma classe de polímeros ricos em fucose. Os fucoïdans exibem diversas bioatividades que tem sido relatadas em vários estudos pré-clínicos. O extrato oral de fucoïdan diminuiu danos no cólon, infiltração celular, edema e a produção das citocinas pró-inflamatórias (LEAN et al, 2015).

IL-1 β e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias potentes que tem múltiplos efeitos, incluindo a ativação de células inflamatórias, a indução de diversas proteínas inflamatórias, citotoxicidade, formação de edema, e a migração de neutrófilos (ROSENBAUM, BONEY, 1991). Os resultados demonstram que o PLS diminuiu a concentração das citocinas na mucosa intestinal inflamada. Estes resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório de PLS pode ocorrer através da inibição de citocinas envolvidas na colite induzida por TNBS.

As citocinas funcionam como mediadores responsáveis por muitas características da inflamação como o recrutamento de neutrófilos e células mononucleares (FIOCCHI et al, 1989). A adesão de leucócitos e recrutamento são aumentadas nos microvasos na doença crônica, mediada, em parte, pela regulação positiva de moléculas de adesão de células endoteliais vasculares e por TNF- α e IL-1 β . Assim, estes resultados mostraram que o PLS tem uma ação na redução da resposta inflamatória por meio da inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias de lesões intestinais de colite induzida por TNBS em ratos. Um possível mecanismo pode envolver a regulação negativa da resposta inflamatória através da inibição da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados pode-se concluir que o polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Digenea simplex*, em modelo de colite em ratos na dosagem de 90mg/kg possui ação anti-inflamatória, pois foi capaz de reduzir diversos parâmetros inflamatórios tais como critérios macroscópicos e microscópicos, peso úmido, níveis de IL-1 β e TNF- α , mieloperoxidase e malondialdeído. Observou-se também que os níveis de nitrato e nitrito foram reduzidos durante o tratamento com o polissacarídeo, reduzindo, pois, o estresse oxidativo. Este polissacarídeo sulfatado aumentou os níveis de glutathione, inferindo-se que esta alga possui propriedade gastroprotetora.

Em suma, pode-se inferir dos resultados encontrados no presente estudo que a alga marinha *Digenea simplex* possui propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Ressalta-se a possibilidade de que através de estudos mais aprofundados, esta alga futuramente possa ser inserida como tratamento natural e alternativo para pacientes portadores da Doença de Crohn, pois a mesma além de reduzir o processo inflamatório desta doença de maneira similar ao tratamento utilizado atualmente, possa causar menos efeitos colaterais ao paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, C.; CHO, J. H. **Inflammatory Bowel Disease Genetics: Nod2**. Annual Review of Medicine. v.58, p. 401-416. 2007.

ANANTHI, S. et al. **In vitro antioxidant and in vivo antiinflammatory potential of crude polysaccharide from Turbinaria ornata** (Marine Brown Alga). Food Chem. Toxicol. v.48, p.187-192. 2010.

ANTUNES, M.V. et al. **Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 44, p.279-287. 2008.

APPLEYARD, C.B.; WALLACE, J.L. **Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs**. Am. J. Physiol. v. 269, p. 119-25. 1995.

AQUINO, R. S. et al. **Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications**. Glycobiology. v. 15, p. 11-20. 2005.

ARAÚJO, S.E.A. et al. **Doença de crohn intestinal: manejo**. Rev.Assoc. Med. Bras. v.57, p.10-13. 2011.

AROSA, F., A. E CARDOSO, E., M. Linfócitos T. (Ed.). **Fundamentos de Imunologia**. Lisboa, Lidel, pp. 127-145. 2007.

ASSREUY, A.M.S. et al. **Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae Champia feldmannii**. Biol. Pharm. Bull. v. 31, p. 691-695 2008.

BALDASSANO, R.N.; PICCOLI, D.A. **Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients**. Gastroenterol Clin North Am. v.8, p.445-58. 1999.

BATISTA, J. A. et al. **Polysaccharide isolated from Agardhiella ramosissima: Chemical structure and anti-inflammation activity**. Carbohydrate Polymers. v.99, p.59-67. 2014.

BELASCO, A.G.S.; SOUZA, M.M.; NASCIMENTO, J.E.A. **Perfil Epidemiológico dos Pacientes Portadores de Doença Inflamatória Intestinal do Estado de Mato Grosso**. Rev. Bras. Coloproct. v.28, p.324-328. 2008.

BERNSTEIN, C.N. et al. **World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010**. Inflamm Bowel Dis. v.16, p.112-124. 2010.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. **Introdução: As algas do Brasil**. In: FORZZA, R. C.; et al. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro. v. 1, p. 49-60. 2010.

BILATE, A.M.B. **Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas.** Temas de Reumatologia Clínica. v. 08, p.47-51. 2007.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. **Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão.** Rev Bras Coloproct. v. 23, p.172-182. 2003.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. **Marine natural products.** Nat, Prod. Resp. v. 23, p. 26-78. 2006.

BOUMA, G.; STROBER, W. **The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease.** Nature reviews immunology. v.3, p.521-533. 2003.

BRADLEY, P.P., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. **Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation.** Blood, v. 60, p. 618–622. 1982.

BRAHAM, C.; CHO, J. H. **Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Disease.** N Engl J Med. v. 361, p. 2066-78. 2009.

BRITO, T. V. et al. **Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signaling pathway.** Journal of pharmacy and pharmacology. v.65, p.724-733. 2013.

BRITO, T.V. et al. **Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats.** Journal of pharmacy and pharmacology. v.66, p.1161-1170. 2014.

BUSSEROLLES, J. et al. **Protection against 2,4,6 – trinitrobenzenesulphonic acid – induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M.** Biochemical pharmacology. v.69, p.1433-1440. 2005.

CAMPBELL, S.; GHOSH, S. **Is neutropenia required for effective maintenance of remission during azathioprine therapy in inflammatory bowel disease?.** Eur J Gastroenterol. v.13, p.1073-76. 2001.

CÁSSARO, C. M. F.; DIETRICH, C. P. **Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates.** J. Biol. Chem., Bethesda. v.252, p.2254-2261. 1977.

CHAMBERLIN, W.M.; NASER, S., A. **Integrating theories of the etiology of Crohn's disease.** On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. Medical Science Monitor. v.12, p. 27-33. 2006.

CIACCI, et al. **O peptídeo kissper do kiwi exibe efeitos anti-inflamatório e anti-oxidante em modelos intestinais humanos in-vitro e ex-vivo.** British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology. v.175, p.476–484. 2013.

CNUBBEN, N.H.P. **The interplay of glutathione – related processes in antioxidante defense.** Environmental toxicology and pharmacology. v.10, p.141-152. 2001.

COLOMBEL, J.F. et al. **A Controlled Trial Comparing Ciprofloxacin with Mesalamine for the Treatment of Active Crohn's Disease.** Am J Gastroenterol. v.94, p.674-78. 1999.

COSTA, L. S. et al. **Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds.** Biomedic. Pharmacother. v. 64, p. 21-28. 2010.

COURA, C. O. **Atividades antinociceptiva e anti-inflamatórias dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria córnea* J. agardh.** 2011.123f. Dissertação. (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CRUZ, W.A.S. **Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas.** 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CUNHA, A.A. **Avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo experimental de hiper – homocisteinemia severa.** 2012. 205f. Dissertação (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CUZZOCREA, S. et al. **Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.** Pharmacol. Rev. v.53, p.135-159. 2001.

DAL SECCO D, et al. **Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase.** Nitric Oxide. Elsevier. v.15, p. 77-86. 2006.

DAMASCENO, S. R. B. et al. **Role of the NO/K_{ATP} pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice.** Rev. Brasileira de Farmacognosia. v.23, p.320-328. 2013.

ELSON, C.O. et al. **Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota.** Immunol Rev. v. 206, p. 260-76. 2005.

ENGEL, M. A.; NEURATH, M. F. **New pathophysiological insights and modern treatment of IBD.** J. Gastroenterol. v.45, p.571-583. 2010.

ESBERARD, B.C. **Etiopatogenia das doenças inflamatórias intestinais.** Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. v.11, p.1-5. 2012.

EWE, K.; HERFARTH, C.; MALCHOW, H.; JESDINSKY, H.J. **Postoperative recurrence of Crohn's disease in relation to radicality of operation and sulfasalazine prophylaxis: a multicenter trial.** Digestion. v. 42, p.224-32. 1989.

FARIA, L.C., FERRARI, M.L.A., CUNHA, A.S. **Aspectos clínicos da doença de Crohn em um centro de referência para doenças intestinais.** GED Gastroenterol Endosc Dig. v. 4, p. 151-64. 2004.

FELDMAN, J. F., GARDNER, G.; DENISON, R. **Genetic analysis of the circadian clock of Neurospora.** In The Nato Foundation, Biological Rhythms and their Central Mechanism (ed. M. Suda, O. Hayaishi and H. Nakagawa). North-Holland: Elsevier Biomedical Press. pp. 57-66. 1979.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev.Ass.Med. Brasil. v.43, p.61-68. 1997.

FIOCCHI, C. et al. **Intestinal immune reactivity to interleukin 2 differs among crohn's disease, ulcerative colitis, and controls.** *Gastroenterology*. v.97, p.1-9. 1989.

GABURRI, P. D. et al. **Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da Doença de Crohn: um estudo de 60 casos.** *Arquivos de Gastroenterologia*. v.4, p.240-246. 1998.

GIRARDIN, S. et al. **Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection.** *The Journal of Biological Chemistry*. v.278, pp. 8869-8872. 2003.

GOES, A.C.A.M. **A eletroacupuntura atenua a colite experimental induzida por TNBS via ativação de interleucina 10 e inibição de óxido nítrico sintase induzida.** 2014. 113f. Dissertação (Doutorado em Cirurgia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GREEN, L.C. et al. **Analysis of nitrate, nitrite and 15N in biological fluids.** *Anal Biochem*. v.126, p.131–136. 1982.

GUIRY, M.D. **Macroalgae of Rhodophycota, Phaeophycota, Chlorophycota, and two genera of Xanthophycota, in:** Costello, M.J. et al. (Ed.) (2001). European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. *Collection Patrimoines Naturels*, v. 50, p. 20-38. 2001.

HANAUER, S.B.; SANDBORN, W. **The Practice Parameters Committee of The American College of Gastroenterology.** Management of Crohn's Disease in Adults. *Am J Gastroenterol*. v. 96, p. 635-643. 2001.

HEAD, K.N.D.; JURENKA, J.M.T. **Inflammatory bowel disease part II: Crohn's Disease – pathophysiology and conventional and alternative treatment options.** *Alternative Medicine Review*. v.9, p.360-401. 2004.

JÚNIOR, L. B. **Metodologias par avaliação de etoricoxibe por cromatografia líquida e espectrometria de massas.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

KOBAYASHI, K.S.; CHAMAILLARD, M.; OGURA, Y. **NOD2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract.** *Science*. v. 307, p.731-734. 2005.

KOlios, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. **Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle.** Immunology. v.133, p.427-437. 2004.

KORTE, R.L. **Doença de crohn.** Rev.Med. v.67, p.14-18. 1987.

KRAAK, L.V.D.; GROS, P.; BEAUCHEMIN, N. **Colitis – associated colon cancer: is it in your genes?.** Gastroenterology. v.21, p.11688-11699. 2015.

LAURIENZO, P. **Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview.** Marine Drugs. v.8, p.2435-2465. 2010.

LEAN, Q.Y, et al. **Fucoidan Extracts Ameliorate Acute Colitis.** PLOS ONE. v. 10, p.1-18. 2015.

LICHTENSTEIN, G.R. **Treatment of fistulizing Crohn’s Disease.** Gastroenterology. v.119, p.1132-47. 2000.

LIM, W.S. et al. **Tuberculosis and Treatment with Infliximab.** N Engl J Med. v.346, p.623-26. 2002.

MARCELINO, M. Y. **Emprego de terapia celular em modelo experimental de doença inflamatória intestinal.** 2012. 69f. (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARKS, D.J.B. et al. **Defective acute inflammation in crohn’s disease: a clinical investigation.** Lancet. v.367, p.668-678. 2006.

MATHEWS, M. B. **Polyanionic proteoglycans.** In: Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution. Kleinzeller; Springer, G. F.; Witmann, H. G. (eds.). Berlin: Springer-Verlaq. pp.93-125. 1975.

MEDEIROS, J. R. et al. **A sulfated-polysaccharde fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproen-induced gastrointestinal damage in rats.** Mar. Drugs. v. 10, p. 2618-2633. 2012.

MEISTER, A. **Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal: Applications in research and therapy.** Pharmacol. Ther. Oxford. v.51, p.155-194. 1991.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.** Anal Biochem. v. 86, p. 271-278. 1978.

MORRIS, G.P. et al. **Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.** Gastroenterology. v. 96, p. 795-803. 1989.

MOWAT, C. et al. **Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults.** Gut. v.60, p.571-607. 2011.

NEURATH, M. F. et al. **The Transcription Factor T-bet Regulates Mucosal T Cell Activation in Experimental Colitis and Crohn's Disease.** J. Exp. Med. v. 195, p. 1129-1143. 2002.

OLIVEIRA, F. M.; EMERICK, A. P. C.; SOARES, E. G. **Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais.** Cienc. Saúde Coletiva. v.15, p.1031-1037. 2010.

ORIDA, N.K; LAI, C.; **Nitric oxide and renal patients.** Dial Transplant. v. 29, p. 174-185. 2000.

ORTIGOSA, L. **Concepto actual y aspectos clínicos de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.** Colom Med. v.36, p.16-24. 2005.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** Physiological reviews. v.87, p.315-424. 2007.

PAIVA, L. A. F. **Estudo do potencial antiinflamatório do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* desf. (Copaíba) e de seu constituinte diterpênico ácido kaurenóico nos modelos experimentais de inflamação intestinal.** 2004. 202f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PANJAMURTHY, K. et al. **Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis.** Cellular and Molecular Biology Letters. v.10, p.255–264. 2005.

PAVLICK, K. P. et al. **Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease.** Free Radic. Biol. Med. v.331, p.311-322. 2002.

PELUSO, I., PALLONE, F., MONTELEONE, G. **Interleukin-12 and Th1 immune response in crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication.** World Journal of Gastroenterology. v.12, p. 5606-5610. 2006.

PEREIRA, J. G. et al. **Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses.** Carbohydrate Polymers. v. 108, p. 17-25. 2014.

PEREIRA, M. G. et al. **Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?** Carbohyd. Res. Oxford. v.340, p.2015-2023. 2005.

POLI, D. D. **Impacto da raça e ancestralidade na apresentação e evolução da Doença de Crohn no Brasil.** 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

PRESENT, D.H. et al. **Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.** NEJM. v.340, p.1398-1405.1999.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants.** New York: Worth Publ., 2001. p. 791.

ROSENBAUM, J.T.; BONEY, R.S. **Use of a soluble interleukin-1 receptor to inhibit ocular inflammation.** *Curr Eye Res.* v.10, p.1137–1139. 1991.

ROZAS, E.; FREITAS, J. C. **Anti-inflammatory activity of the apolar extract from the seaweed *Galaxaura marginata* (rhodophyta, nemaliales).** *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* v.13, p.544-548. 2007.

RUBIN, E., PALAZZA, J., P. **Doença intestinal inflamatória.** In: Rubin, E., Gorstein, F., Rubin, R., et al. (Ed.). *Patologia. Bases clinicopatológicas da Medicina.* 4. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 710, 725-730. 2006.

SANTOS, A. C.; MARTINS, M. do C. de C. **Efeitos de imunomoduladores na Doença de Crohn.** *Rev. Saúde Pública.* v. 6, p. 71-79. 2013.

SANTOS, S. de C. **Doença de Crohn: Uma abordagem geral.** 2011. 47f. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SANTOS, S. M. R. **Doença de Crohn: Etiopatogenia, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento.** 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado e Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. **Estimation of Total Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent.** *Analytical Biochemistry,* v. 25, p.1192-1205. 1968.

SILVESTRE, P. P. et al. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* v. 377, p.139–148. 2008.

SOLBERG, I. G. et al. **Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study).** *Scand J. Gastroentero.* v.44, p.431-440. 2009.

SONG, et al. **Efeitos anti-inflamatórios da Formula Herbal chinesa FAHF -2 em Doença Inflamatória Intestinal experimental e humana.** *Inflamm Bowel Dis.* 2014 January. v.20, p.144–153. 2014.

STANGE, E. F. et al. **European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis.** *J. Crohns Colitis.* v.2, p.1-23. 2008.

STEIN, R.B.; LICHTENSTEIN, G.R. **Medical Therapy for Crohn's Diseases-The State of the Art.** *Surg Clin North Am.* v.81, p.71-101. 2001.

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R.S. **The immunology of mucosal models of inflammation.** *Rev. Immunology.* v.20, p. 495-549. 2002.

SUMMERS, R.; SWITZ, D.; SESSIONS, J.T.; BECKTEL, J.M.; BEST, W.R.; KERN, F. **National Cooperative Crohn's Disease Study: Results of Drug Treatment.** *Gastroenterology.* v.77, p.847-869. 1979.

TAVARES-MURTA B.M. et al. **Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. v.138, p. 93-99. 2008.

WOOD, A.J. **Drug Therapy:** Inflammatory Bowel Disease. NEJM. v.334, p.841-848. 1996.

YAMADA, T. et al. **Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin.** Inflammation. v.17, p.641-662. 1993.

XANTHOS, T. et al. **Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease.** Annals of Gastroenterology. v.28, p.210-220. 2015.

ZATERKA, S. **Lesões induzidas por AINES no sistema digestório.** Revista Bras. de Medicina. v.57, p.882-900. 2000.

ZHAO, et al. **Moxabustão e acupuntura melhoram a Doença de Crohn, regulando o equilíbrio entre as células Th17 e Treg na mucosa intestinal.** v.15, p.1-11. 2015.

APÊNDICE

TÉCNICAS UTILIZADAS EM HISTOLOGIA

Inicialmente as amostras passaram pela fixação, sendo que a primeira etapa foi a desidratação, quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool através da imersão em álcoois que possuem concentrações crescentes. A diafanização é a etapa seguinte, com a substituição do álcool, agora presente nos tecidos, por xilol. Finalmente, na impregnação, o xilol foi substituído por parafina fundida a 80° em pequenos blocos. Neste momento a catalogação do bloco foi realizada para posterior identificação da peça.

A etapa da microtomia consistiu, basicamente, em utilizar um micrótomo para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas. Foram obtidos cortes com 6 micrômetros.

Os cortes obtidos a partir do micrótomo foram transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. A água do banho-maria estava a 53°C. Nesta etapa, são retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo do corte. Após a distensão, os cortes foram separados individualmente, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente e álcool 70% e previamente secas. Antes da utilização das lâminas, estas foram revestidas com uma fina camada de albumina para facilitar a adesão da peça. As lâminas com os cortes agora aderidos foram separadas para secagem por 24 horas.

A coloração consiste numa etapa muito importante para a visualização das estruturas do tecido. Normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis, sendo necessário, deste modo, a remoção da parafina da peça que foi preparada nas etapas descritas anteriormente e que permanece na lâmina de vidro. Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a Hematoxilina e a Eosina (HE).

Para corar peças incluídas em parafina é necessária a retirada da parafina e a hidratação da peça. Este procedimento foi realizado a partir de uma seqüência de banhos em xilol, álcool e água, inversamente ao procedimento executado na etapa de inclusão. O procedimento foi o seguinte:

- Banho de xilol II _____ 7min
- Banho de xilol I _____ 3min

- Álcool 100% _____ 7min
- Álcool 90% _____ 2min
- Álcool 75% _____ 2min
- Álcool 50% _____ 2min
- Álcool 30% _____ 2min
- Água destilada I _____ 2min
- Água destilada II _____ 2min

Após a hidratação, os cortes foram corados com a técnica de hematoxilina-eosina conforme a seguir:

- 1º) Corar em hematoxilina por 2min;
- 2º) Lavar em água corrente por 3,5min;
- 3º) Corar em eosina por 5min;
- 4º) Lavar em água corrente por 3min.

A montagem final da lâmina consistiu em depositar uma gota de resina líquida sobre o corte que estava aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamínula. Nesta etapa evitou-se a formação de bolhas de ar que costumam se formar na resina durante a colocação da lamínula. Finalmente a lâmina foi catalogada. A resina depois de seca garantiu uma lâmina permanente que poderá durar anos.

ANEXO

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFPI.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 61049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "O uso do polissacarídeo sulfatado da *Digenea simplex* (pls) como terapia alternativa para o tratamento da Doença de Crohn experimental induzida por tñbs em ratos", protocolo nº 023/15, sob a responsabilidade de ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6 899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 19/06/2015.

Vigência do Projeto	Julho/ 2015 à Fevereiro/ 2016
Espécie/ linhagem	Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	72
Peso/ Idade	150- 200 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central do CCA/UFPI

Teresina, 19 de Junho de 2015


 Prof^a. Ivetê L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora